J. M. Ashworth

Zell-differenzierung



Gustav Fischer Verlag Stuttgart



Absender
(Studenten bitte Heimatanschrift angeben):

....

....

....

Beruf: ....

Ashworth. V.74. 4,4. nn. Printed in Germany

Bitte ausreichend frankieren

Werbeantwort/Postkarte

Gustav Fischer Verlag

D-7000 Stuttgart 72

Postfach 720143

Bestellkarte

Ich bestelle aus dem Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, über die Buchhandlung

....

Führer zur modernen Biologie

.... Expl. Davies, Funktionen biologischer Membranen, DM 8,80

.... Expl. Garrod, Zellentwicklung, DM 8,80

.... Expl. Woods, Biochemische Genetik, DM 8,80

.... Expl. ....

.... Expl. ....

.... Expl. ....

.... Expl. ....

(Bestellmöglichkeiten für die am Schluß des Buches angezeigten Titel)

Preisänderungen ohne Vorankündigung vorbehalten

.... Datum

.... Unterschrift

Naturwissenschaften

- ☐ Allgemeine Biologie
- ☐ Zytologie, Physiologie
- ☐ Mikrobiologie
- ☐ Wasser-, Boden- und Lufthygiene
- ☐ Botanik
- ☐ Angewandte Botanik/Pharmakognosie
- ☐ Zoologie
- ☐ Anthropologie, Evolution, Genetik
- ☐ Geographie
- ☐ Physik, Chemie, Geologie, Astronomie
- ☐ Geschichte der Naturwiss.

- ☐ Teilverzeichnis Medizin
- ☐ Teilverzeichnis Naturwissenschaften
- ☐ Teilverzeichnis Wirtschafts- und Sozialwissenschaften

Wenn Sie sich über weitere Neuerscheinungen des GUSTAV FISCHER VERLAGS, STUTTGART, auf Ihrem Fachgebiet unterrichten wollen, schicken wir Ihnen auf Wunsch laufend kostenlos Informationen zu.

Bitte kreuzen Sie Ihre Interessengebiete an, und lassen Sie uns diese Karte ausgefüllt wieder zugehen.

J. M. Ashworth

Zelldifferenzierung

Originaltitel: Cell Differentiation
Original English language edition published
by Chapman and Hall Ltd., London 1973

ISBN 3-437-20128-X

Satz: Oelschlägersche Druckerei, Calw
Druck: Offsetdruckerei Karl Grammlich, Pliezhausen
Einband: Sigloch KG, Stuttgart
Printed in Germany

Vorwort der Herausgeber

Von einem Studenten der Biologie im höheren Semester wird erwartet, daß er mit der derzeitigen Forschung im Bereich seines Faches vertraut ist. Neue Forschungsarbeiten werden in verwirrender Vielfalt veröffentlicht, und sie gehen unvermeidlicherweise sehr ins Detail. Allein die bloße Anzahl der Fachzeitschriften und Veröffentlichungen verursacht Verwirrung, und es ist äußerst schwierig, sich deren Inhalt anzueignen. Übersichtsartikel setzen in der Regel Grundkenntnisse auf dem Gebiet voraus und sind notwendigerweise in ihrer Thematik eingeschränkt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für kurze, aber kompetente Einführungen in jene Bereiche der modernen Biologie, die in den gewöhnlichen Lehrbüchern entweder gar nicht oder nicht ausführlich genug behandelt werden. Davon ausgehend soll es dem Studenten möglich sein, auch die schwierigeren Artikel mit Gewinn zu lesen. Die vorliegende Reihe soll dazu beitragen, die bestehende Lücke zu schließen.

Die Autoren dieser Reihe wurden gebeten, einen kurzen Überblick über ihr Fachgebiet zu geben. Dabei wurde angenommen, daß die Leser sich bereits einiges Wissen auf dem Gebiet der allgemeinen Biologie angeeignet haben. Die Reihe baut auf dieser Basis auf und liefert damit einen theoretischen Rahmen, innerhalb dessen die moderne Forschung voranschreitet. Sie soll dem Leser Zugang zu theoretischen und praktischen Problemen verschaffen, die überwunden werden müssen, wenn ein Fortschritt erzielt werden soll. Wir hoffen, daß die Studenten damit beginnen, die ausführlicheren Berichte und Artikel, auf die in diesem Buch hingewiesen wird, mit größerem Verständnis zu lesen, und daß sie diese in die moderne Forschung besser eingliedern können. So soll ihnen bei der Wahl der eigenen Forschungsrichtung geholfen werden.

Die vorliegenden Bändchen sind keine Lehrbücher, sondern »Führer«. Da die moderne Forschung sich wenig um die akademische Aufgliederung kümmert, der Lehre und Lehrbücher der Biologie notwendigerweise folgen, haben wir uns in dieser Reihe darum bemüht, Leitfäden für jene Wissenschaftsbereiche zu schaffen, die zwischen mehreren akademischen Disziplinen liegen oder diese überschneiden. Denn gerade auf diesen Gebieten ist die Kluft zwischen Veröffentlichungen und Lehrbüchern und damit der Bedarf nach einführenden Darstellungen am größten. Wir hoffen, daß wir auf diese Weise die grundlegenden

Lehrbücher ergänzt und erweitert, jedoch nicht überflüssig gemacht haben. Vielleicht können wir den Studenten helfen, Einsicht in das Voranschreiten der modernen biologischen Forschung zu gewinnen und zugleich ein erfolgreiches Examen vorzubereiten.

T. W. Goodwin, Liverpool · J. M. Ashworth, Leicester

Inhalt

1. Einleitung

Die Entwicklung eines Embryos ist ein so großartiges biologisches Phänomen, daß man es mit gewisser Ehrfurcht betrachten muß. Das Studium der Zelldifferenzierung läßt sich bis ins Altertum zu Aristoteles und noch weiter zurück verfolgen. Jedoch gibt es nur wenige moderne Wissenschaften, die ihren Gründern mehr als oberflächliche Beachtung schenken, und nur wenige Studenten scheinen an den Gedanken ihrer Vorgänger interessiert zu sein. Doch die Embryologie ist dabei eine seltene Ausnahme – eine Wissenschaft, bei der die Probleme, Theorien und häufig auch Methoden, die uns heute interessieren, im Wesentlichen dieselben sind, die unsere Kollegen vor 50 oder sogar 100 Jahren fesselten. Sie definierten die Probleme und gaben ihnen Namen, die heute noch üblich sind. Eine knappe Zusammenfassung darüber, wie sich ein »typisches« tierisches Ei entwickelt, dient als Einführung. Außerdem soll uns das Beispiel mit den heutigen Vorstellungen zur Zelldifferenzierung bekannt machen.

Das Froschei ist wie andere Eier eine hochspezialisierte Zelle, die aus einem haploiden Zellkern und einem festen und streng geordneten Zytoplasma besteht. Die äußere Schicht des Zytoplasmas (Cortex) ist deutlich abgegrenzt. Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche Dottertröpfchen, die am hell gefärbten vegetativen Pol der Zelle angehäuft sind (Abb. 1.1). Andere Zellorganellen sind ungleich entlang der Längsachse des Eis verstreut. Die Frage nach den Kräften, die diese Polarität bewirken, zeigt das erste Problem auf, das die Embryonalentwicklung stellt. Die Befruchtung des Eis durch ein Spermium löst eine sofortige und komplexe Reaktion aus. Um das Ei entwickelt sich eine Befruchtungsmembran, die den Eintritt anderer Spermien verhindert. Die beiden haploiden Kerne fusionieren, und innerhalb von rund 30 min beginnt der pigmentierte Cortex unter Berücksichtigung des darunterliegenden Zytoplasmas zu wandern. Währenddessen zeigt sich gegenüber dem Punkt, an dem das Spermium eingetreten ist, am Ei ein grauer Bereich, der zunehmend deutlicher wird. Ein weiteres Beispiel für die Ausbildung einer Polarität: Bald nach der Befruchtung tritt die Zygote in eine Periode schneller Kern – und Zellteilungen ein. Das Ergebnis dieser Teilungen ist, daß das Eizytoplasma in zahlreiche Zellen geteilt wird, deren Verhältnis von Kernvolumen zu Zytoplasma größer ist als jenes, das man in »durchschnittlichen« Körperzellen fin-

det. Während dieses Teilungsprozesses nimmt weder die Zellmasse noch die Größe der Zellen zu, sondern es wächst nur die Anzahl der Zellen. Auf diese Weise wird die Polarität, die im Ei liegt und als Inhomogenität des Eizytoplasmas zum Ausdruck kommt, in eine neue Polarität übertragen. Diese zeigt sich im unterschiedlichen Zellverhalten, entsprechend wie das Zytoplasma auf die Zellen der sich entwickelnden Blastula aufgeteilt wird (Abb. 1.1). Die Einzelheiten des Teilungsprozesses und die Form der sich daraus ergebenden Blastula sind sehr verschieden. Dies hängt von der Art des Eis ab und besonders von der Menge des darin enthaltenen Eidotters. Jedoch beenden in allen Fällen die

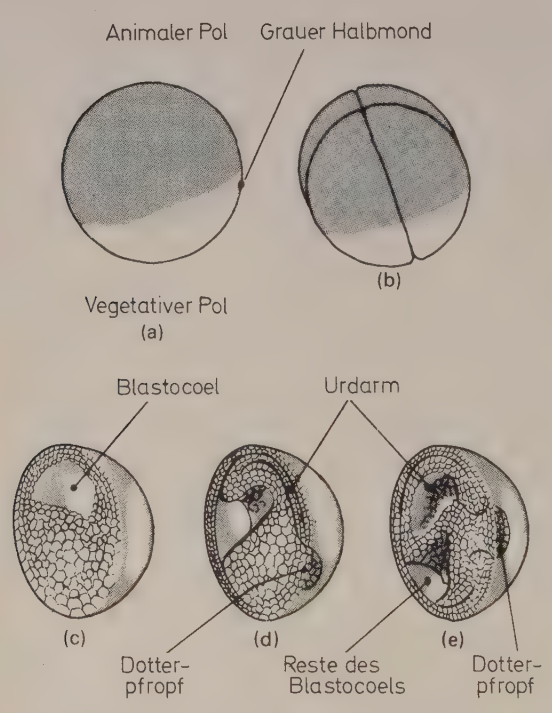


Abb. 1.1: Entwicklung des Froscheis: (a) unmittelbar nach der Befruchtung; (b) 4-Zell-Stadium, Seitenansicht; (c) späte Blastula; (d) mittlere Gastrula; (e) späte Gastrula; (a, b) ganzer Embryo; (c, d, e) Medianschnitte von der dorsalen Seite oder von hinten. (Nach Ebert und Sussex 1970)

Zellen der Blastula schließlich ihre schnellen Teilungen und treten in eine Phase intensiver und entscheidender Bewegungen, die miteinander in Zusammenhang stehen. In diesem Stadium der Gastrulation scheinen die Zellen einer bestimmten Region die Schlüsselrolle bei der Organisation zu spielen. (Beim Frosch ist es der Bereich des Zytoplasmas, zu dem der graue Halbmond gehört.) Aus den koordinierten Zellbewegungen bei der Gastrulation entstehen Zellschichten und Pole des Embryos. Alle Aktivitäten des Embryos bis zu dieser Stufe wurden durch Nährstoffe ermöglicht, die bereits im Ei vorhanden waren. Bei vielen Organismen, wie z. B. beim Seeigel, entwickelt sich die Gastrula aber rasch in eine frei lebende Larve, die sich selbst zu ernähren beginnt. Auch bei jenen Organismen, deren Gastrula nicht selbstständig lebt, ist dies das Stadium, in dem der Embryo von vielen aus dem Ei stammenden Nährstoffen unabhängig wird. Er beginnt eine Anzahl lebensnotwendiger Biosynthesen selbst durchzuführen. Das Ergebnis der Gastrulation ist die Ausbildung von Zellschichten aus der relativ undifferenzierten Blastula. Außerdem lagern sich Zellen aneinander, die in der Blastula weit voneinander entfernt waren. Solche Zellen können sich vermutlich gegenseitig beeinflussen, um Strukturen auszubilden, die ihrer neuen Lage im Embryo entsprechen. Als Folge embryonaler Wechselwirkungen oder Induktionen, wie sie auch genannt werden, gelangen die Zellen in eine zwangsläufige Entwicklung, die von nun an die Teilungen bestimmt. Jede Zellschicht der Gastrula wirkt nun auf das entsprechende Gewebe. Dies geschieht durch Zellteilung, Zellwanderung und durch die Wechselwirkung von Zellen. Sie scheinen im Prinzip ähnlich zu sein wie jene, die während der Teilung und der Gastrulation auftreten. Den gesamten Vorgang, der die genaue räumliche Verteilung bestimmt, nennt man »Musterbildung«. Das letzte Stadium der Entwicklung ist erreicht, wenn die Zellen zur entsprechenden Zeit ihren endgültigen determinierten Zustand erreichen und sich in die entsprechenden Zelltypen ausdifferenzieren. Differenzierung schließt die Bildung von spezialisierten Zellorganellen und/oder die Produktion spezifischer, biochemischer Endprodukte ein, die die große Zahl verschiedener Zelltypen des erwachsenen Organismus charakterisieren. Dies ist die letzte Stufe in einem Gesamtprozeß. Obwohl die fünf Grundzüge des sich entwickelnden Systems, die wir angesprochen haben (Polarität, Induktion, Determination, Musterbildung und Differenzierung) unabhängig voneinander be-

handelt werden können, darf man nie vergessen, daß sie Bestandteile eines fortlaufenden Prozesses sind. Die aufgezeigten Unterscheidungsmöglichkeiten sind nur zu unserem besseren Verständnis gerechtfertigt. Von diesen fünf Vorgängen sind vier (Polarität, Determination, Musterbildung und Induktion) im Wesentlichen interzelluläre Phänomene, die als Folge einer Wechselwirkung von Zelle zu Zelle auftreten. Die Zelldifferenzierung dagegen ist vorwiegend ein intrazelluläres Phänomen, das die Wechselwirkung von Kern und Zytoplasma der Einzelzelle betrifft. Dies scheint eine vernünftige und brauchbare Unterscheidung zu sein. Darum werden wir in diesem Buch ausschließlich die Zelldifferenzierung so behandeln, wie sie oben definiert wurde. Mit den interzellulären Aspekten befaßt sich D. R. Garrod in einer anderen Ausgabe dieser Reihe.

2. Strategie und Taktik

Um ein komplexes Phänomen wie die Zelldifferenzierung experimentell in Angriff zu nehmen, gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste können wir »Reduktionsmethode« oder »Annäherung durch Vereinfachung« nennen. Das Gesamtproblem wird dabei in einige kleinere Probleme zerlegt, so wie wir es im vorigen Teil getan haben. Man muß dann ein Tier oder eine Pflanze finden, die einfach genug sind und gerade solche Merkmale aufweisen, die für das Verständnis von jedem Teilproblem nötig sind. Dabei könnte man z. B. an Bakteriophagen (kurz Phagen genannt) denken. Sie sind die einfachsten lebenden Systeme (aus chemischer Sicht), an denen man die Vererbung von Mutationen zeigen kann. Für Untersuchungen zur Natur und Eigenschaft des genetischen Materials sind sie geeignet, und in diesem Fall erwies sich die Reduktionsmethode natürlich als ungeheuer erfolgreich.

Die zweite Methode, die wir als das »klassische Vorgehen« bezeichnen können, ist komplizierter und spitzfindiger. Man kann annehmen, daß als Ergebnis des starken Evolutionsdruckes jede denkbare Eigenschaft oder Möglichkeit, die in der molekularen Struktur der lebenden Organismen angelegt sind, von irgend einem Lebewesen auch ausgeprägt und extrem übertrieben wurde. Das Problem dabei ist, diesen Organismus zu finden und das

deutlich ausgeprägte, nur ihm eigene Merkmal zu erkennen. Die polytänen Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen einiger Insektenlarven sind dafür ein Beispiel. Dort sind hunderte oder tausende von DNS-Molekülen aneinandergereiht und werden zur gleichen Zeit aktiv. Wenn dies zutrifft, spiegelt das sichtbare Verhalten dieser Riesenchromosomen exakt das sonst unsichtbare Verhalten der einzelnen DNS-Moleküle wieder. Durch das Studium an Riesenchromosomen können wir ableiten, was mit den DNS-Molekülen geschieht, sowohl in Zellen, die polytäne Chromosomen enthalten, als auch analog dazu in Zellen ohne Polytänie. Genau wie Eizellen mit einem sehr geringen Verhältnis von Kern- zu Zytoplasmamenge, benötigen Zellen in verschiedenen Stadien und zu verschiedenen Zeiten besondere Mechanismen, um die Aktivität ihrer ribosomalen Gene selektiv zu steigern. Beim Studium dieses einen Teilbereiches des sonst so schwierigen und unübersichtlichen Zellgeschehens können wir, oder hoffen es wenigstens, die Grundregeln entdecken, nach denen die Expression aller Gene verläuft.

Beide Methoden ergänzen sich gegenseitig. Tatsächlich jedoch wurden in der Biologie zunächst mit der ersten Methode Fortschritte erzielt. Erst später übernahm die zweite Methode die führende Rolle. Ein Großteil der Faszination und Spannung bei der biologischen Forschung liegt im Wissen, wann welche Einstellung die richtige ist. Leider erkennt man oft erst nachträglich, welche Methode jeweils die richtige war, um ein Problem zu lösen. Jeder muß selbst entscheiden, was insgesamt am Vorteilhaftesten ist.

In diesem Buch werde ich zunächst einige einfache Systeme beschreiben, die nach Ansicht von Befürwortern der Reduktionsmethode geeignete Modelle für das Studium der Zelldifferenzierung darstellen. Mit den Systemen will ich bestimmte Probleme herausstellen. Danach will ich solche Systeme prüfen, die nach der klassischen Methode ideal sind, auf Probleme der Zelldifferenzierung eine Antwort zu geben.

3. Modellsysteme — einfache Beispiele als Schlüssel zu komplexen Problemen

3.1. Bakteriophagen

In der Einleitung haben wir die Embryonalentwicklung des Froscheis besprochen. Wir sahen, daß Zellen, die von derselben Zelle (Zygote) abstammen, sehr unterschiedliche Leistungen vollbringen und ganz verschiedene Ziele haben können. Alle Zellen in Abb. 1.1 haben eine Vergangenheit und eine Zukunft. Ihre Entwicklung hängt weitgehend davon ab, wie die Gegenwart Vergangenes und Zukünftiges miteinander verbindet. Wenn der Faktor »Zeit« das Hauptproblem ist, müssen wir nach einem möglichst einfachen lebenden System fragen, bei dem in zeitabhängiger Folge gut definierte und meßbare Veränderungen vorkommen. Die Bakteriophagen (Phagen) scheinen diese Voraussetzungen zu erfüllen. Bei Abb. 3.1 sieht man, daß ein typischer $T_{geradzahlig}$-Phage, wie z. B. T_2, eine komplexe und wohldefinierte Struktur besitzt. Die Phagen sind deshalb so einfach, weil sie ihre eigene Replikation nicht ohne fremde Hilfe durchführen können. Der Lebenszyklus eines $T_{geradzahlig}$-Phagen (Abb. 3.2) beginnt mit

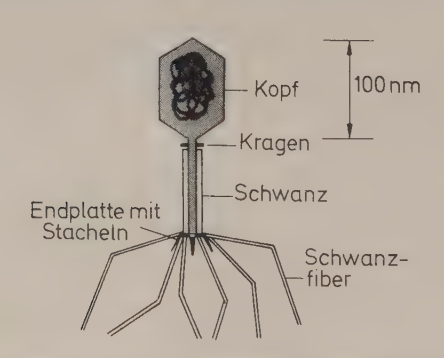


Abb. 3.1: Aufbau eines $T_{geradzahligen}$ Phagen (nach Davidson 1972)

dem Einschleusen der Phagen-DNS in eine Bakterienzelle. (Ein Großteil der komplexen Struktur in Abb. 3.1 ist am Schutz und am Einschleusen der DNS beteiligt). Ungefähr 30 min nach der Infektion platzt die Wirtszelle, und einige Hundert reife Phagenpartikel werden ins Medium entlassen, um andere Zellen zu infi-

zieren. Biochemische Analysen haben gezeigt, daß während dieser 30 min zahlreiche neue, phagenspezifische, enzymatische Aktivitäten in der Zelle auftreten. Bei Schnitten, die man von infizierten Zellen gemacht hatte, sah man, daß parallel zu diesen nacheinander ablaufenden biochemischen Ereignissen ebenso in ganz bestimmter Folge morphologische Veränderungen auftreten (Abb. 3.2). Sie werden durch Enzyme hervorgerufen, die in bestimmter Reihenfolge nacheinander synthetisiert werden. Seitdem bekannt ist, daß diese Enzyme an kurzlebigen Boten-RNS-Molekülen (messenger-RNS) synthetisiert werden [1], fragt man sich, wie und warum zu verschiedenen Zeiten der Infektion verschie-

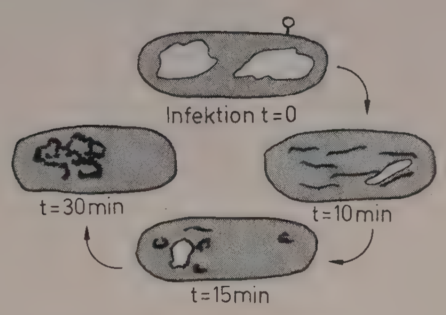


Abb. 3. 2: Vermehrungszyklus von $T_{geradzahligen}$ Phagen; die weißen Bereiche sind bakterielle DNS, t = 10 min – erste fibrilläre Phagen-DNS; t = 15 min – neugebildete Phagen treten auf

dene Boten-Moleküle gemacht werden (vgl. Abb. 3.2). Der Phagenpartikel besitzt keinerlei Enzymaktivität, auch keine DNS-abhängige-RNS-Synthetase (Transkriptase). Deshalb muß das erste RNS-Molekül, das an der eingeschleusten Phagen-DNS transskribiert wird, bei seiner Synthese das Wirtsenzym als Katalysator verwenden. Eingehende Untersuchungen zur Enzymologie von *Escherichia coli* wurden durch die Unbeständigkeit dieser Enzyme erschwert. Außerdem zeigten Wood und Berg [2], daß es wohl möglich war, RNS-Moleküle zu synthetisieren. Jedoch erwiesen sich diese Moleküle als inaktiv, als ein biologischer Test für Boten-RNS (die Fähigkeit, die Proteinsynthese zu steigern) durchgeführt wurde. (Die Synthese der RNS-Moleküle wurde zuerst mit der Einbaurate von ^{32}P-Nukleotiden in Makromoleküle gemessen.) Mit anderen Worten, es schien so, als ob das Enzym manchmal biologisch sinnvolle und manchmal unsinnige

Moleküle hervorbrachte. Die Erklärung dafür liegt sicherlich teilweise in der Eigenschaft der DNS – denaturierte DNS neigt dazu, unsinnige RNS-Moleküle zu synthetisieren –. Doch als das Enzym von *E.coli* schließlich sehr rein vorlag, fand man, daß die komplexe Struktur des Enzymmoleküls selbst der Grund war. Die Transkriptase bestand aus zwei Komponenten, die man Kernstück (core) und σ-Faktor (σ = sigma) nannte. Diese beiden Komponenten wurden durch die vielen Schritte, die zur Reinigung von Enzymen üblich sind, zuletzt fast völlig getrennt. Nun hatte man eine Erklärung für die aufgetretene »Labilität« des Enzyms. Der »core« scheint das aktive Zentrum des Enzyms zu enthalten, da er die Synthese von makromolekularer RNS an den verschiedenen DNS-Präparaten katalysiert. Aber diese RNS-Moleküle waren Unsinn-Moleküle. Der σ-Faktor war für die Synthese von biologisch sinnvollen Molekülen notwendig. Wenn man den σ-Faktor zum core hinzufügt, wird die Synthese von Unsinn-RNS unterdrückt. Außerdem wird die katalytische Aktivität des Enzyms so beeinflußt, daß nur bestimmte Regionen der DNS als Template für die RNS-Synthese benutzt werden.

Tab. 1: Aktivität der *E.coli* Transkriptase

DNS-Matritze	Aktivität *	
	Core	Core + σ
T_4 nativ	0,5	33
T_4 denaturiert	0,5	6,1
Kalbsthymus nativ	14,2	32,8
Kalbsthymus denaturiert	3,3	14,5

* In relativen Einheiten; nach [3]

Der σ-Faktor hat offensichtlich selbst keine enzymatische Aktivität wie z. B. die Nukleaseaktivität. Der Faktor tritt nur als Protein in Erscheinung, das die Aktivität anderer Proteine – den core – beeinflußt. Solche indirekt wirkenden Proteine oder Polypeptide sind wahrscheinlich auch bei anderen Systemen weit verbreitet, doch beginnt man erst jetzt ihre Bedeutung zu erkennen (vgl. 4.5).

Man sieht in Tabelle 1, daß T_4-DNS ein brauchbares Template für das Enzym von *E.coli* ist, doch sieht man auch, daß nur einige Abschnitte der DNS in Gegenwart des σ-Faktors tatsächlich

transkribiert wurden [4]. Eines der wenigen mRNS-Moleküle trat als Code für ein Protein in Erscheinung, das dem σ-Faktor ähnlich ist. Denn falls jetzt Transkriptase nicht von reinen, sondern von mit T_4-Phagen infizierten *E.coli*-Zellen verwendet wurde, werden andere Abschnitte der T_4-DNS in RNS-Kopien übertragen. Durch die Trennung der beiden Präparate fand man die richtige Erklärung. Man konnte zeigen, daß sie wohl denselben core, aber verschiedene σ-Faktoren besitzen. Es ist interessant, daß dieser σ-Faktor, der von T_4-Phagen codiert wurde, das core-Protein von *E.coli* so beeinflußt, daß es nur DNS von T-Phagen erkennt. Er fördert die RNS-Synthese anderer Phagen, wie z. B. der λ-Phagen oder T-Phagen nicht. Die Erklärung für die Synthese verschiedener RNS-Moleküle zu verschiedenen Zeiten, die der Abb. 3.2 zu Grunde liegt, wird damit offensichtlich. Die Wirtstranskriptase transkribiert nur gewisse Abschnitte der eingedrungenen DNS. Diese RNS-Moleküle codieren solche Proteine, die beim Infektionszyklus zuerst auftreten. Ein Molekül davon ist dem σ-Faktor ähnlich. (Dabei wird der Mechanismus zur Proteinsynthese des Wirts in Anspruch genommen.) Der σ-Faktor des Phagen verdrängt dann den σ-Faktor von *E.coli* aus seiner Verbindung mit dem core und verändert so die spezifische Wirksamkeit des Enzyms. Dies führt zum Stop der Synthese »früher« RNS-Moleküle und leitet die Bereitstellung von »späten« RNS-Molekülen ein. Sie codieren Proteine, die beim Infektionszyklus erst später in Erscheinung treten. Damit wird deutlich, daß es an der DNS spezifische Abschnitte gibt, die von der Transkriptase erkannt werden, und die den Beginn der RNS-Synthese kontrollieren. Solche Abschnitte wurden sowohl bei *E.coli* als auch bei Phagen mittels genetischer Arbeitsmethoden bestimmt. Man nannte sie Promotorregionen. Wir können uns daher vorstellen, daß gemeinsam transkribierte Gene ähnliche Promotoren besitzen. Die Synthese einer Gruppe von RNS-Molekülen kann gleichzeitig mit beginnender Synthese des entsprechenden σ-Faktors für eine andere Gruppe von Molekülen gestoppt werden. Dies ist eine positive Kontrolle, wobei der σ-Faktor das Auftreten einer bestimmten Molekülgruppe verursacht. Man muß sie von der ebenfalls bekannten und äußerst wichtigen negativen Kontrolle unterscheiden (vgl. S. 14), die das Auftreten einer bestimmten Molekülgruppe verhindert. Durch neuere Arbeiten wurde dieses einfache Schema erweitert und komplizierter gemacht. Travers hat diese Arbeiten für die Bakterientranskrip-

tase zusammengefaßt [5]. Es ist sicher, daß sowohl der core, als auch der σ-Faktor selbst aus Untereinheiten aufgebaut ist. Genau so gut wie Teile der Transkriptase ohne weiteres ersetzt werden können, werden phagenspezifische Veränderungen durch Molekülbestandteile hervorgerufen, die in großer Menge vorrätig sind. Es ist ebenso sicher, daß die einfache Aufteilung des Infektionszyklus in zwei Abschnitte mit frühen und späten Funktionen zu stark vereinfacht ist. Die frühen Funktionen wurden z. B. in »sehr frühe« und in »frühe« aufgeteilt. Aber trotz dieser Ausweitung blieb die Grundidee einer zeitlichen Kontrolle der m-RNS-Synthese durch σ-Faktoren mit unterschiedlichen Promotoreigenschaften erhalten. Wenn man mit Phagen experimentiert, ist es ein großer Vorteil, daß sie eingehenden genetischen Ultrastrukturanalysen zugänglich sind. Den Entwicklungsphysiologen interessieren im allgemeinen Funktionen, die für das Überleben der Organismen wichtig sind. Daraus könnte man schließen, daß genetischen Arbeitsmethoden geringere Bedeutung zukommen, seitdem Letalmutationen im Mittelpunkt des Interesses stehen. Bei den Phagen und einigen anderen Organismen kann man aber konditional-letale Mutanten erhalten. Sie sind nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen Mangelmutanten, und man kann sie für genetische Analysen einsetzen. Zwei Arten der konditional-letal Mutanten wurden benutzt. Die erste und am häufigsten eingesetzte Art der temperatursensitiven Mutanten leitet sich von der Tatsache ab, daß sich die Phagen bei 37° C oder 42° C entwickeln. Man kann Phagenmutanten erhalten, die sich bei 37° C normal entwickeln, dagegen nicht mehr bei 42° C. Bei diesen Linien wird durch die Mutation in der Regel die Aminosäuresequenz so verändert, daß die Temperaturstabilität des Enzyms beeinflußt, dabei aber die katalytische Aktivität auf der niedrigeren oder zulässigen Temperatur belassen wird [6]. Die andere Art der konditional-letal Mutationen betrifft die Wirtsspezifität. Wildtypphagen können in einer Reihe von verschiedenen *E.coli* Stämmen wachsen, obwohl die verschiedenen Bakterienstämme unterschiedlich auf fremde DNS reagieren und ihr Protein nicht immer auf gleiche Weise synthetisieren. Man kann die Nukleotidsequenz eines Phagengens so verändern, daß die Phagen in einem Stamm von *E.coli* noch wachsen können, in einem anderen aber nicht. Durch die Analyse tausender konditional-letal Mutanten dieser zwei Arten wurde es möglich, eine Genkarte des Phagen aufzustellen, auf der die Anordnung der

verschiedenen Gene nebeneinander berücksichtigt ist (Abb. 3.3). Wie die Genkarte einiger anderer Phagen und Bakterien, ist auch die Genanordnung der $T_{geradzahlig}$-Phagen ringförmig. Man erkannte bald, daß zusammenhängende Funktionen oft im selben Bereich der Genkarte beieinander liegen. So fand man alle frühen Funktionen eng beieinander im 10—12-Uhr-Bereich der Genkarte. Obwohl einige der konditional-letal Mutanten unter den eingeschränkten Bedingungen ihren Lebenszyklus nicht zu Ende führen konnten, erkannte man, daß manche wenigstens einen Teil des Zyklus durchlaufen konnten. Durch die gemeinsame Auswertung der morphologischen und genetischen Untersuchungen ergab sich, daß die Gene, die am Aufbau derselben Struktur beteiligt sind, auch meist im selben Bereich der Genkarte nebeneinander liegen.

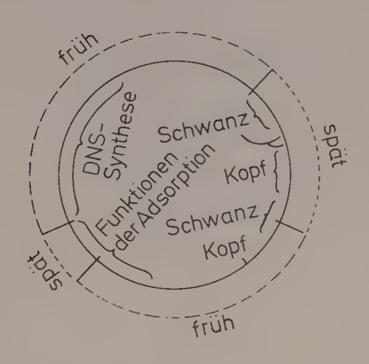


Abb. 3.3: Vereinfachte Genkarte eines T-Phagen. Die Gene, die an der Ausbildung derselben Struktur beteiligt sind, liegen beieinander

Für den Aufbau der morphologischen Struktur scheinen viele Genprodukte notwendig zu sein. Allein 21 Gene sind z. B. für den Aufbau des Schwanzes nötig (Abb. 3.1), obwohl man bisher keineswegs so viele Proteine im Schwanz eines reifen Phagen gefunden hat. Folglich müssen viele dieser Genprodukte irgendwie an der Auswahl der spezifischen Bausteine oder am Zusammenbau der mehrteiligen Struktur beteiligt sein [7]. Seitdem es in jüngster Zeit möglich geworden ist, die *in vitro* Synthese vieler Phagenpartikel in gemischten Kulturen zu beobachten, kann man solche Voraussagen rasch nachprüfen. Die gemischten Extrakte

erhält man aus Bakterien, die mit verschiedenen Mutanten infiziert wurden. Dies würde bedeuten, daß ein Großteil der genetischen Information dazu gebraucht wird, die morphologische Struktur spezifisch festzulegen. Falls dieselben Regeln, die für den Aufbau von Phagenpartikeln gelten, z. B. auch für den des Nervensystems gelten sollen, würde wahrscheinlich eine unglaubliche Anzahl »morphogenetischer Prinzipien« benötigt.

Damit ergeben sich aus den Untersuchungen über den Lebenszyklus der Phagen drei Grundgedanken:

1. Durch spezifische Veränderungen der Transkriptase wird die zeitliche Kontrolle der mRNS-Synthese erreicht.
2. Gene mit gemeinsamer Aufgabe können auf der Genkarte – und damit im DNS-Molekül – beieinander liegen.
3. Um eine komplexe morphologische Struktur artspezifisch festzulegen, ist sehr viel genetisches Material notwendig.

3.2. Enzyminduktion bei Bakterien

Es ist ein wenig verwirrend, daß zwei in der Sache unterschiedliche Phänomene wie Embryonalinduktion und Enzyminduktion ähnlich benannt werden. Der Grund liegt darin, daß man lange gehofft hatte, allgemeine Zusammenhänge aufzudekken, die für beide Systeme gelten. Wer das Phänomen zu bearbeiten begann, setzte unbedenklich Bakterien als Modellsysteme zum Studium der Embryogenese ein. Das erste, vollständig analysierte System war die Induktion der β-Galaktosidase von *E.coli K 12*. Inzwischen ist sehr viel über dieses System bekannt. Erst kürzlich wurde ein Buch zu diesem aktuellen Thema veröffentlicht [8]. Die meisten der üblichen Lehrbücher enthalten ein ähnliches Schema wie Abb. 3.4, das auf die ursprüngliche Darstellung in der klassischen Veröffentlichung von Jacob und Monod zurückgeht [9]. Eine ausführliche Darstellung der Zusammenhänge, die der Abb. 3.4 zu Grunde liegen, kann man bei Woods [10] nachlesen. Die Situation läßt sich kurz in folgenden Punkten zusammenfassen.

1. Der genetische Bereich, der die Aktivität der β-Galaktosidase bei *E. coli* kontrolliert, besteht aus drei Strukturgenen. Sie legen die Aminosäuresequenzen fest: Gen z für β-Galaktosidase, Gen y für eine Permease der β-Galaktoside (das Protein ist an der Aufnahme beteiligt), Gen a für eine Transacetylase, deren physiologische Funktion noch unbekannt ist.

2. Drei weitere Gene kontrollieren koordiniert die Aktivität dieser drei Strukturgene.
3. Eines dieser Gene – das Gen i – ist das Strukturgen für ein Regulatorprotein, den sogenannten Repressor. Er kann sowohl kleine Moleküle (Induktoren) binden, als auch sich an einen Bereich der DNS anlagern, der unmittelbar neben dem Gen z liegt und Operator oder Gen o genannt wird. Wenn sich der Repressor mit einem Induktor verbindet, kann er sich nicht mehr am Operator anlagern. Ist er frei von Induktoren, verbindet er sich mit der DNS.
4. Der Promotorbereich, an dem sich die Transkriptase zuerst an die DNS anlagert, liegt unmittelbar neben dem Operator. Die Transkriptase kann sich nur dann entlang der DNS bewegen und damit am Gen z die Transkription beginnen, wenn kein Repressor am Operator gebunden ist.
5. Den ganzen Komplex der Gene i, p, o, z, y, a nennt man »Operon« oder genauer »lac Operon«, da Laktose das physiologisch wichtige Substrat für β-Galaktosidase ist.

Es waren vorwiegend genetische Experimente, die zum Schema der Abb. 3.4 führten. Die Ergebnisse stammen teilweise von Untersuchungen mit Mutanten, die ohne Induktor β-Galaktosidase produzieren, oder von solchen Mutanten, die gar keine produzieren. Letztere haben selbstverständlich Defekte in den Regulatorgenen des Operons. Genaue Genkartierung und Komplementationstests solcher Mutanten ergaben die Gene i, p und o. Ähnliche Untersuchungen wurden mit anderen Operons von *E.coli* durchgeführt, besonders mit solchen, die am Stoffwechsel und an der Biosynthese von Tryptophan, Histidin und Arginin beteiligt sind. Bei den Biosynthesen entdeckte man, daß ein Stoffwechselendprodukt vorhanden sein muß, um den Repressor an den Operator zu binden und damit die Transkription der Strukturgene für Enzyme zu verhindern. In diesem Sinne wirken die Endprodukte der Biosyntheseketten, die ein geringes Molekulargewicht haben, genau umgekehrt wie die Induktoren der katabolischen Enzyme. Eingehende Untersuchungen dieser anderen Systeme haben gezeigt, daß sie sich auch in anderer Hinsicht vom lac Operon unterscheiden [10, 11]. Sie sind in vielen Bereichen bedeutende Ergänzungen der einfachen Darstellung von Abb. 3.4. Selbstverständlich kann man sich mit passender Kombination positiver Kontrollelemente (z. B. σ-Faktor/Promotor) und negativer Kontrollelemente (z. B. Repressor/Operator-System)

theoretische Schemata von fast endloser Komplexität ausdenken. Diese kann man auf viele Beispiele der Proteinsynthese während der Entwicklung anwenden. Man hat inzwischen auch solche Schemata entwickelt [12]. Aber ohne weitere genetische Analysen, die noch viel genauer sein sollten als solche, die man gegenwärtig für höhere Organismen kennt, müssen diese Modelle hypothetisch bleiben.

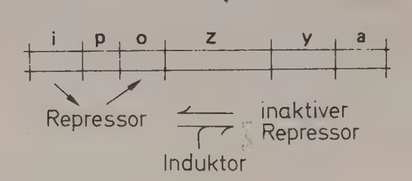


Abb. 3.4: Regulation des lac-Operons

Man erkannte schon vor vielen Jahren, daß die Fähigkeit vieler Bakterien-Operons, auf ihre Kontrollmechanismen zu reagieren, quantitativ vom Zellstoffwechsel abhängt. Die Induktoren der β-Galaktosidase regen z. B. die Synthese der β-Galaktosidase bei *E.coli* in einem glukosehaltigen Medium weniger stark an als in einem glycerinhaltigen Medium. Solche Effekte werden wahrscheinlich durch die Konzentrationsänderungen einer Verbindung, dem 3′, 5′-zyklischen AMP (oder cAMP) hervorgerufen. Der cAMP-Spiegel gibt den Ernährungszustand der Zelle wieder. *E.coli* Zellen enthalten ein cAMP bindendes Protein. Wenn es an cAMP gebunden ist, kann es im Promotorbereich des lac Operons eine unterstützende Funktion haben.

Durch Untersuchungen zur Enzyminduktion bei Bakterien erhielt man einen Einblick, wie auch die Proteinsynthese kontrolliert werden könnte.

1. Man stellte dabei Kriterien auf, mit denen Kontrollelemente auf der Ebene der DNS erkannt werden können.
2. Man zeigte, daß es neben verschiedensten qualitativen Alles- oder Nichts-Mechanismen auch andere gibt, die das Ausmaß einer Genaktivität quantitativ beeinflussen.

3.3. Sporenbildung und Sporenreifung bei Bakterien

Alle Proteine eines Operons werden gemeinsam reguliert, d. h., zu irgend einem Zeitpunkt läuft entweder an allen oder an gar keinem die Proteinsynthese ab. In einem sich differenzierenden

System konnte man jedoch eine zeitabhängige Veränderung der Proteinsynthese beobachten. Deshalb versuchte man ein bakterielles System zu finden, bei dem dieser Gesichtspunkt des sich entwickelnden Systems auch beobachtet werden könnte. Mit den hochentwickelten genetischen Techniken könnte man dabei sicher Fortschritte erzielen. Man müßte untersuchen, wie man die Zeitabhängigkeit mit den bereits erwähnten Kontrollsystemen in Verbindung bringen könnte. Es gibt zwei in diesem Zusammenhang interessante Systeme. Das erste ist eigentlich so selbstverständlich, daß es oft übersehen wurde. Ein Bakterium hat eine genau festgelegte Morphologie. Vermehrt es sich, scheint es logisch zu sein, daß seine Komponenten synthetisiert und zusammengelagert werden müssen, um diese Morphologie in einer genau kontrollierten und integrierten Weise auszubilden. Die Untersuchungen über Wachstum und Teilung eines Bakteriums sollten eine zeitabhängige Folge von Ereignissen zeigen, die genau so exakt ablaufen, wie die uns bereits bekannte Phagenreplikation. Es ist möglich, Bakterienkulturen zu erhalten, die weitgehend synchron wachsen. In diesen Kulturen geschieht in allen Bakterien dasselbe. Untersuchungen hierüber haben in der Tat einen zeitabhängigen Wechsel in der Makromolekülsynthese gezeigt, dem ein Kontrollmechanismus (vgl. 3.2) überlagert ist [13]. Jedoch sind sie nicht so weit fortgeschritten, daß wir begreifen, wie die Zeitabhängigkeit zu Stande kommt.

Einige Bakterien, besonders *Bazillen* und *Clostridien*, durchlaufen eine zeitabhängige Entwicklung anderer Art, die viel eher als Analogie zur Differenzierung höherer Organismen angesehen werden kann. Unter gewissen Umwelteinflüssen können diese Bakterien Sporen bilden, die sich in der Morphologie und der Stoffwechselaktivität sehr stark von den normalen vegetativen Zellen unterscheiden. Wenn sie unter den entsprechenden Bedingungen – alle für das Wachstum verwertbaren Kohlenhydrate wurden aufgebraucht – nicht unmittelbar verhungern, bilden die einzelnen Zellen einer Kultur gleichzeitig Sporen. Dabei erfolgt eine Reihe deutlich regulierter und eng verknüpfter Veränderungen der Proteinsynthese und der Morphologie (Abb. 3.5). Da die Sporulation stattfindet, wenn günstige exogene Energiequellen und Stoffwechselzwischenprodukte fehlen, treten als erste Veränderungen neue hydrolytische Enzyme auf, und ein Großteil der vegetativen Zelle wird rasch abgebaut. Die so gewonnenen Nährstoffe werden dann für die Bildung sporenspezi-

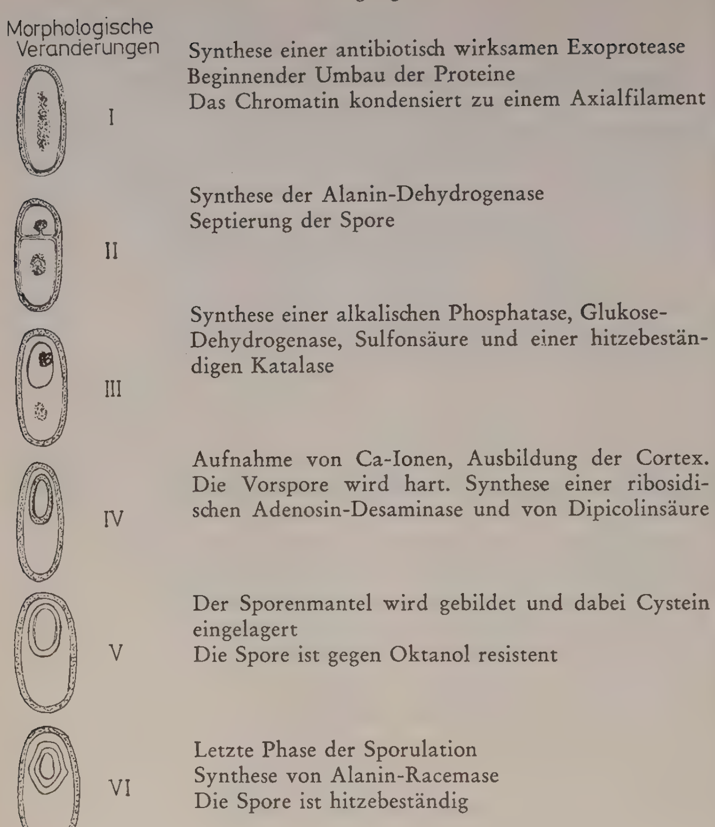


Abb. 3.5: Morphologischer und biochemischer Verlauf der Sporulation bei Bacillus spp. Nach [16]

fischer Moleküle eingesetzt. Man weiß ziemlich sicher, daß die Transkriptaseaktivität eine der vielen Funktionen der vegetativen Zelle ist, die verändert werden müssen. Der Phage Φe repliziert sich nur in einer vegetativen Zelle, in einer sporenbildenden Zelle dagegen ist die Φe DNS brauchbares Template für die Transkriptase [14]. In ähnlicher Weise wird die Aldolase der

vegetativen Zelle durch eine Protease in eine für die Spore charakteristische Form der Aldolase verändert [15]. Damit scheint in diesen Fällen der Verlust oder die Veränderung eines Enzyms oder einer Enzymaktivität ebenso bedeutend zu sein, wie sonst das Auftreten neuer Enzyme oder neuer Enzymaktivität bei der Differenzierung.

Man machte viele Versuche, um herauszufinden, wann die vegetative Zelle unwiderruflich zur Sporulation übergeht, – denn dieser Übergang würde genau dem in der Einleitung besprochenen Determinationsprozeß entsprechen. Aus einigen Untersuchungen ergab sich [16], daß es weniger ein einziger Zeitpunkt ist, an dem die Zelle zur Sporulation übergeleitet wird. Es sind vielmehr verschiedene bestimmbare Stadien im Gesamtverlauf des Zellgeschehens, die den Übergang festlegen (Abb. 3.5). Jeder Übergang stellt wahrscheinlich die Synthese einer spezifischen mRNS dar. Denn die Überleitung zu einem neuen Zellgeschehen und die Fähigkeit der Zelle, es auszuführen, findet in Gegenwart von Actinomycin D im Grund genommen gleichzeitig statt. (Actonomycin D hemmt die Transkription.) Die Überleitung zu einem neuen Zellgeschehen erfolgt ungefähr eine Stunde vor dem eigentlichen Ereignis. Man kann dies mit der Halbwertszeit der mRNS-Moleküle in sporenbildenden Zellen erklären. Sie ist viel länger als die durchschnittliche Halbwertszeit von mRNS in vegetativen Zellen, (dort beträgt sie zwischen 2 und 10 min) obwohl in sporenbildenden Zellen eine erhöhte Ribonukleaseaktivität auftritt. Die Untersuchungen zur »Einleitung neuer Zellgeschehen« und zur Stabilität der mRNS wurden nicht überall vorbehaltlos anerkannt. Es liegen auch andere Interpretationen vor [17].

Die Keimung von Bakteriensporen ist von großer ökonomischer Bedeutung. Sie verläuft ähnlich zeitabhängig und ist experimentell interessant, da große Sporenpopulationen gleichzeitig zur Keimung angeregt werden können. Solche Untersuchungen brachten jedoch wenige grundsätzlich neue Erkenntnisse.

Die Arbeiten zur Sporenbildung bei den Bakterien haben damit zwei neue Gedanken zur Diskussion über die Zelldifferenzierung beigetragen:

1. Wenn ein bestimmter Prozeß des Zellgeschehens beendet wird, kann das für die Zelldifferenzierung ebenso wichtig sein wie der Neubeginn eines bestimmten Prozesses.

(2) mRNS-Moleküle können in derselben Zelle zu verschiedenen

Zeiten sehr unterschiedliche Halbwertszeiten besitzen. Es muß daher Kontrollmechanismen geben, die zwar nach der Transkription eingreifen, aber bevor die Proteine vollständig synthetisiert wurden und aktiv sind.

3.4. Sind Prokaryonten geeignete Modelle für Eukaryonten?

Während alle lebenden Organismen auf molekularer und biochemischer Ebene erstaunlich ähnlich sind, gibt es doch wichtige und grundlegende Unterschiede zwischen Prokaryonten (Viren, Bakterien und Blaualgen) einerseits, und Eukaryonten (alle anderen Lebewesen) andererseits. Die Zelldifferenzierung verläuft bei beiden recht unterschiedlich. Bei den Eukaryonten ist sie in der Regel das Endergebnis einer Reihe verwickelter interzellulärer Wechselwirkungen. Bei den Prokaryonten dagegen ist die Zelldifferenzierung gewöhnlich ein intrazelluläres Phänomen. Während man unter Prokaryonten leicht Beispiele für eine zeitabhängige Zelldifferenzierung findet, lassen sich solche für eine räumliche Differenzierung, wie sie z. B. für einen Embryo typisch ist, nur schwer finden. Es gibt demnach zwischen diesen beiden Zellklassen auf molekularer und biochemischer Ebene sowohl sehr reale Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten.

In Abb. 3.6 werden die typischen Merkmale von Prokaryonten und Eukaryonten zusammengefaßt. Über die moderne Zytologie gibt es eine hervorragend illustrierte und allgemein anerkannte Zusammenfassung [18]. Neben dem Größenunterschied der beiden Zellen in Abb. 3.6 (ein Bakterium ist ungefähr so groß wie ein Mitochondrium), ist der auffälligste Unterschied das verwickelte System von Membranen und membrangebundenen Zellorganellen bei den Eukaryonten. Seitdem bekannt ist, daß der Stofftransport durch Membranen ein regulierter Prozeß ist [19], weiß man auch, daß die Eukaryontenzelle im Zellinnern kleine Bereiche (compartments) aufrecht erhalten kann, in denen vermutlich miteinander unverträgliche Stoffwechselprozesse ablaufen. Einige dieser Organellen, z. B. die Mitochondrien und Chloroplasten, enthalten DNS und sind deshalb bis zu einem gewissen Maß autonom. Die umfassende und unübersichtlichere Morphologie bringt jedoch keine größere biochemische Kapazität mit sich. Im Gegenteil, aus rein biochemischer Sicht ist ein Bakterium wie *E.coli* oder *Pseudomonas* weitaus vielseitiger als eine menschliche Zelle. Das Bakterium kann weit mehr chemische Re-

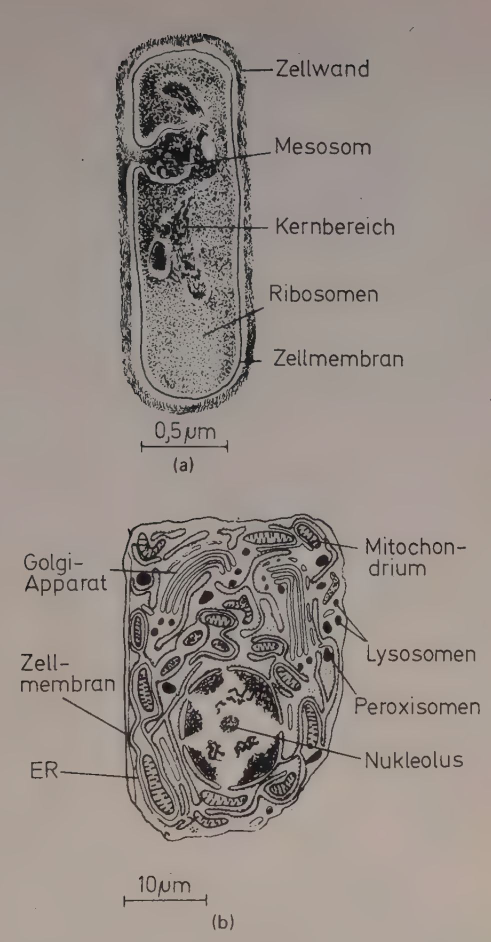


Abb. 3.6: Feinbau einer prokaryontischen Zelle (a, Bacillus) und einer eukaryontischen Zelle (b, Säugetierleber). Nach Novikott und Holtzmann 1970

aktionen durchführen. Die Eukaryontenzelle kann dafür ihr geringeres biochemisches Repertoire kontrollieren und damit besser ausnützen. Das von der Zelldifferenzierung gesetzte Problem verlangt nicht primär die Entdeckung neuer chemischer Reaktionen, sondern vielmehr, wie allgemein verbreitete Reaktionen in

verschiedenen Zellen und in derselben Zelle zu verschiedenen Zeiten unterschiedlich kontrolliert werden können. Daraus folgt natürlich, daß den Prokaryonten genau die Kontrollelemente fehlen können, die für die Zelldifferenzierung bei höheren Organismen äußerst wichtig sind. Unter den Prokaryonten besitzen die *Bazillen, Actinomyceten* und Blaualgen das komplexeste Muster der Zelldifferenzierung (einschließlich einiger interzellulärer Effekte) [20]. Sie sind zugleich die Prokaryonten, die das beste interne Membransystem haben.

Der andere große Unterschied zwischen den Zellen in Abb. 3.6 betrifft ihre DNS. Die Prokaryonten haben keinen echten Zellkern. Ihre DNS besteht aus einem einzigen, oft ringförmigen Molekül, das auf keine erkennbare Weise mit irgend einem anderen Zellbestandteil (außer vielleicht der Zellmembran) verbunden ist. Bei Eukaryonten ist die DNS dagegen in Zellorganellen eingeschlossen. In einer Zellorganelle, dem Kern, ist die DNS mit beträchtlichen Mengen von Protein und RNS verbunden, um eine andere Struktur, die Chromosomen, zu bilden. Bei den Eukaryonten gibt es somit die Möglichkeit, die Genaktivität durch die Regulation der Chromosomenstruktur und/oder durch die Regulation der jeweils verfügbaren DNS zu steuern. Überdies haben eingehende Untersuchungen der DNS-Struktur von Eukaryontenzellen gezeigt, daß, obwohl die Chromosomen-DNS dieselbe chemische Struktur wie Prokaryonten-DNS aufweist, die »biologische« Struktur sehr unterschiedlich ist. Die »biologische« Struktur bezeichnet die Verteilung der Nukleotidsequenzen entlang dem DNS-Molekül.

Erste Hinweise auf Unterschiede der Eukaryonten-DNS ergaben Untersuchungen zum DNS-Gehalt diploider Zellen bei verschiedenen Organismen (Tabelle 2). Bei den verschiedenen Arten von Eukaryonten gibt es zwischen DNS-Gehalt und morphologischer Komplexität oder Entwicklungsstufe keine wirkliche Korrelation. Interessanterweise sind die beiden *Chironomus*-Arten, die in 4.1.2 besprochen werden, nahe genug verwandt, um sie erfolgreich zu kreuzen. Doch unterscheidet sich der DNS-Gehalt ihrer Zellen mengenmäßig um ein Vielfaches des DNS-Gehaltes von *E.coli.* Ein großer Teil der DNS trägt keine »Information«, d. h., sie codiert keine Aminosäuresequenzen für ein Protein, doch spielt sie eine gewisse Rolle bei der Erhaltung der Chromosomenstruktur. Demgegenüber gibt es eine zweite Erklärung, wonach der DNS-Gehalt einer Zelle von ihrer Entwicklungsge-

schichte abhängt. Dies betrifft mehr die Evolution als irgend einen chemischen oder biochemischen Aspekt der Chromosomenfunktion [21]. Beide Erklärungen schließen sich gegenseitig nicht aus, und überzeugende Argumente wurden für beide vorgetragen.

Seitdem bekannt ist, daß der DNS-Gehalt von Mäusezellen ausreicht, wenigstens tausend mal so viele Proteine zu codieren wie bisher bei Mäusen gefunden wurden, vermutet man, daß ein Großteil der Eukaryonten-DNS keine Information trägt. Es scheint unbegreiflich, daß so viele Proteine bisher unentdeckt blieben – obwohl wir nicht sicher wissen, wie viele man zum Aufbau einer komplexen morphologischen Struktur braucht. Zum anderen gibt es unmittelbare experimentelle Beweise, daß nicht die gesamte DNS Proteinmoleküle codieren kann. Die Dichte der DNS hängt von ihrem Guanin- und Cytosingehalt ab und liegt im Bereich von 1,6–1,8 g/ml. CsCl- und $CsSO_4$-Lösungen liegen in diesem Dichtebereich. Wenn man die Position kennt, bei der die DNS im Dichtegradienten dieser Salze eine Bande ausbildet, kann man ihren G+C Gehalt bestimmten. Ana-

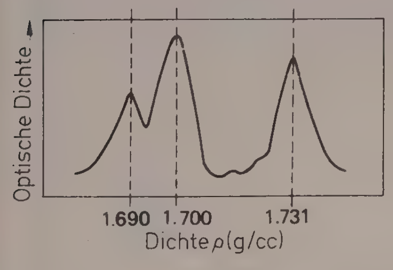


Abb. 3.7: Mäuse-DNS im Dichtegradienten
p=1,69 Kern-Satelliten-DNS
p=1,70 Hauptbande
p=1,731 Kontroll-DNS von Micrococcus

lysiert man DNS-Präparate von Eukaryontenzellen mit hohem Molekulargewicht, erhält man breite Banden. Dies entspricht einer uneinheitlichen Basenzusammensetzung der Moleküle. Man kann auch häufig Schultern oder sogar schwache Peaks von weitaus geringerer Höhe als die Hauptbande der DNS vorfinden. Die »Satellitenbanden« (Abb. 3.7) können die DNS aus Mitochondrien oder Chloroplasten repräsentieren, aber bei einigen Tierarten enthält sogar die aus Kernen gewonnene DNS derartige »Satelliten«. Wenn die DNS-Moleküle mechanisch zerkleinert werden und damit das durchschnittliche Molekulargewicht abnimmt, sind diese Banden schärfer abgesetzt, und die Satellitenbanden des Kerns treten deutlicher hervor und können isoliert

und charakterisiert werden. Eine entsprechende Untersuchung des Kern-α-Satelliten beim ›Guineaschwein‹ hat gezeigt, daß er eine sehr einfache chemische Struktur besitzt. Sie besteht aus der Nukleotidsequenz

5′-CCCTAA-3′
3′-GGGATT-5′

und wird sehr oft wiederholt [22]. Obwohl eine bakterielle DNS-abhängige-RNS-Polymerase diese DNS zur Transkription von RNS benutzen kann, hat man keine Proteinmoleküle mit einer Aminosäuresequenz gefunden, die aus dem Einsatz solcher RNS-Moleküle als mRNS resultieren könnten. Wenn man gereinigte Satelliten-DNS als *in vitro* Matritze einsetzt, kann man mit stark radioaktiv markierter RNS die Transkription histologisch nachweisen. Man kann damit jene Basensequenzen in den Chromosomen lokalisieren, die der Satelliten-DNS komplementär sind. Im Prinzip fixiert man bei dieser eleganten Technik eine Zelle zu einem Präparat. Dann erhitzt man das Präparat, um die DNS zu schmelzen (damit die beiden Stränge der Doppelhelix getrennt werden). Danach inkubiert man das Präparat bei niedrigerer Temperatur in Gegenwart der RNS, um die Bildung von RNS-DNS Hybriden und natürlich die erneute Bil-

Tab. 2: Relativer DNS-Gehalt der Zellen verschiedener Organismen

Organismus	Relativer DNS-Gehalt
$T_{geradzahliger}$ Phage*	0,00006
E. coli*	0,0014
Pilze (Hefe)*	0,007
(Dictyostelium discoideum)*	0,04
Fliege (Drosophila)	0,046
Tunicate (Cioa intestinalis)	0,056
Coelenterate (Cassiopeia)	0,096
Echinoderme (Lytechinus pictus)	0,26
Kröte (Xenopus)	0,86
Maus (Mus musculus)	1,00**
Frosch (Rana pipiens)	13
Lungenfisch (Lepidosiren paradoxa)	35,4

* Haploide Zellen, alle anderen Angaben gelten für diploide Zellen.
** (1,00 = 7×10^{-12} g DNS)

dung einer DNS-DNS Doppelhelix zu ermöglichen. Das Präparat kann man jetzt färben und die DNS nachweisen, und mit einer Autoradiographie kann man die RNS lokalisieren. Auf diese Weise wird die Lage der Satelliten-DNS sichtbar gemacht. Mit dieser Technik hat man gezeigt, daß die Satelliten-DNS des Kerns hauptsächlich in der Zentromerregion der Chromosomen liegt. Doch liegt ein kleiner Teil auch über die Chromosomen verstreut in den Bereichen, die heterochromatisch sind (vgl. 4.1.3) [23].

Jedes Chromosom besitzt ein Zentromer, und man darf eigentlich annehmen, daß auch Organismen ohne deutlich sichtbare Kernsatelliten ähnliche Moleküle haben können. Doch ihr G+C Gehalt verhindert eine Isolierung im DNS-Dichtegradienten. Eine Bestätigung dafür haben die Analysen der Konzentration von Basensequenzen aus DNS-Präparaten gebracht, die nach der Renaturierungstechnik behandelt wurden. Dabei werden die DNS-Moleküle zerkleinert, so daß sie annähernd dieselbe Größe haben, danach werden die Moleküle geschmolzen. Dies verursacht eine nachweisbare Veränderung der Lichtabsorption bei 260 nm und des Verhaltens der Moleküle auf einer Hydroxylapatitsäule. Die geschmolzenen DNS-Präparate werden dann bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes inkubiert, so daß sich erneut die Doppelhelix ausbilden kann. Die Geschwindigkeit, mit der die Renaturierung der DNS-Doppelhelices stattfindet, kann man durch optische Messungen bei 260 nm oder an der Hydroxylapatitsäule beobachten. Viele Faktoren beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit: die Basenzusammensetzung der DNS, der Ionengehalt des Mediums und die Temperatur, bei der die erneute Zusammenlagerung stattfindet. Doch wenn man all diese Faktoren berücksichtigt und konstant hält, kann man die Reaktionsgeschwindigkeit als Maß für die relative Konzentration der verschiedenen Basensequenzen in der DNS betrachten. DNS-Einzelstränge mit einer Basensequenz, die in vielfacher Kopie (ungefähr 1 Million) vorliegt, finden offensichtlich viel schneller einen komplementären Partnerstrang als DNS-Einzelstränge, deren Sequenz nur in einer Kopie vorliegt. Man interpretierte die weite Streuung der ermittelten Renaturierungsgeschwindigkeiten damit, daß sie die zahlreichen Konzentrationen verschiedenster Basensequenzen in der DNS wiedergeben. Die Experimente werden gewöhnlich zusammengefaßt, indem man den Prozentsatz der Renaturierung gegen den C_0t Wert aufträgt. C_0 ist die anfängliche

Konzentration der DNS und t die Zeit (in sec), bei der ein gewisser Prozentsatz renaturierter DNS vorliegt. Solche C_0t Kurven (Abb. 3.8) lassen sich in einem weiteren Schritt interpretieren. Man kann die relative Menge der Basensequenzen in einem Schaubild darstellen (Abb. 3.9) [24].

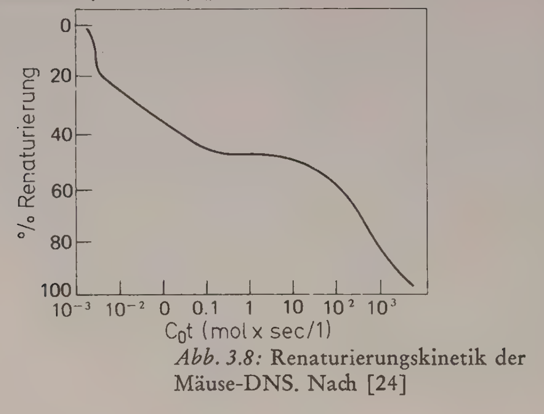


Abb. 3.8: Renaturierungskinetik der Mäuse-DNS. Nach [24]

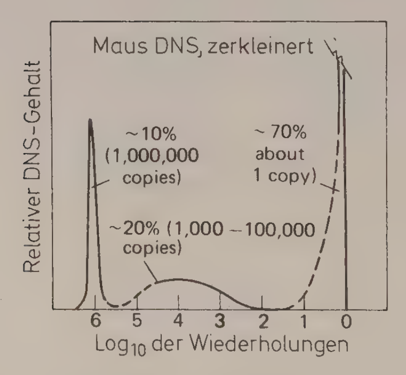


Abb. 3.9: Häufigkeit der repetitiven Nukleotidsequenzen in der Mäuse-DNS (im gestrichelten Bereich ist die Häufigkeit der repetitiven Sequenzen ungewiß). Nach [24]

Der Kernsatellit bei Mäusen besteht zu 10 % aus häufig sich wiederholenden DNS-Sequenzen (hochgradig repetitiver DNS). Diese DNS umfaßt eine Gruppe genügend homogener Moleküle und liegt in ausreichend hoher relativer Konzentration vor, um im Dichtegradienten einen deutlich abgesetzten Peak zu ergeben.

Nicht alle Organismen haben so viel DNS mit derartig hoher Sequenzwiederholung, aber alle Eukaryonten besitzen DNS mit einigen repetitiven Abschnitten.

Die bisher besprochenen Unterschiede zwischen Prokaryonten und Eukryonten (Abb. 3.6) betrafen die Struktur. Man könnte vermuten, daß es auch Unterschiede im dynamischen Verhalten gibt und zum Teil in der Art und Weise, wie verschiedene Ereignisse innerhalb des Zellzyklus ablaufen [13]. Eine Prokaryontenzelle enthält in der Regel nur ein DNS-Molekül, dessen Replikation das weitaus wichtigste Geschehen darstellt. Diese Replikation scheint jedoch nicht sehr eng mit der Zellteilung verknüpft zu sein. Tatsächlich dauert die Replikation von *E.coli B/r* DNS immer 40 min, unabhängig von Veränderungen in der Verdopplungszeit, die zwischen 20 und 60 min variiert. Weil die Verdopplungszeit kürzer sein kann als die Synthesegeschwindigkeit eines DNS-Moleküls und alle Tochterzellen unbedingt ein vollständiges Genom erhalten sollen, müssen weitere Replikationen vor dem Abschluß der ersten eingeleitet werden. Dadurch kommen in einer Bakterienzelle nicht alle Gene gleich häufig vor. Die Gene, die nahe am Initiationsort für die DNS-Synthese liegen, werden früher und damit häufiger repliziert als die weiter vom Initiationsort liegenden Gene. Diese Situation ist bei Eukaryonten unvorstellbar. Bei ihnen muß vor der Zellteilung eine vollständige Trennung der beiden Tochterchromosomen in der Mitose oder Meiose ablaufen. Während dieser Zeit ist die DNS-Synthese unmöglich. Der Zellzyklus bei Eukaryonten (Abb. 3.10) muß immer eine gesonderte S-Phase haben, in der die DNS-Synthese stattfindet. Die S-Phase ist von Perioden ohne DNS-Synthese, den G oder »gap« Phasen, und der Mitose getrennt. Dies bedeutet auch, daß die Eukaryontenzellen eine besser kontrollierte Anzahl von Genen haben. Wahrscheinlich sind verschiedene Kriterien für die Anordnung der Gene auf der Genkarte unter Berücksichtigung des Initiationspunktes für die DNS-Synthese wichtig. Außerdem folgt aus der exakten Regulation des Zellzyklus bei Eukaryonten eine enge Verbindung zwischen den beiden Kontrollen, die die Zelldifferenzierung und den Zellzyklus regulieren.

Embryonalzellen teilen sich in der Regel sehr rasch und haben eine äußerst kurze oder gar keine G1 Phase. Die Zellen älterer Embryonen haben längere Verdopplungszeiten, die gerade ausreichen, um die G1 Phase zu verlängern. Einst glaubte man, daß

sich Zelldifferenzierung und Zellwachstum gegenseitig ausschließen, doch jetzt weiß man, daß dies nicht unbedingt zutrifft. Allerdings teilen sich differenzierte Zellen oft nicht unter normalen Bedingungen. Man könnte davon ausgehen, daß sie sich in einer besonderen G1 Phase – der G_0Phase – befinden. Dies setzt eine bestimmte Entscheidung voraus, die von den Zellen getroffen wurde, um die G_0Phase zu erreichen oder in der auf Teilung ausgerichteten G1 Phase zu verbleiben. Bei einigen Zellen mit

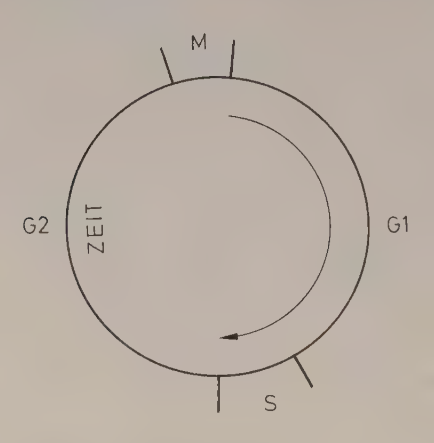


Abb. 3.10: Der Zellzyklus bei Eukaryonten

hormonabhängigen Differenzierungsphänomenen scheint es, als ob die Entscheidung in der vorangehenden G2 Phase fallen würde. Ob dies generell zutrifft oder nicht, das ganze Problem einer Verknüpfung zwischen Zellteilung und Zelldifferenzierung ist mit Sicherheit bei Eukaryonten und Prokaryonten sehr verschieden.

Die Kontrollmechanismen bei Prokaryonten haben eine auffällige Eigenschaft. Gene mit ähnlicher oder im Stoffwechsel zusammenhängender Funktion findet man oft beieinander im selben Bereich der Genkarte, wenn sie nicht sogar wie die Gene z, y und a im lac Operon unmittelbar beieinander liegen. Leider brachten genetische Untersuchungen bei Eukaryonten, einschließlich der mikrobiellen Eukaryonten, nicht dieselben Ergebnisse wie bei Prokaryonten. Es ist bezeichnend, daß man keine Operon-ähnliche Gruppe zusammenhängender Gene nachweisen

konnte. Man kennt eine Anzahl von Genen, die über den Stoffwechsel eng verknüpft sind und auf verschiedenen Genketten (d. h. den Chromosomen) verteilt liegen. Solche Gene scheinen bei den Eukaryonten öfter weit verstreut als eng beieinander zu liegen. Überraschenderweise sind die Gene, die bei *E.coli* eng beieinanderliegen, bei den *Pseudomonaden* auf der Genkarte weit verstreut. Welche Bedeutung dieser Unterschied und der zwischen Eukaryonten und Prokaryonten hat, liegt noch im Dunkeln.

Zusammenfassend gibt es folgende deutliche Unterschiede zwischen Prokaryonten- und Eukaryontenzellen:

1. Zellstruktur und Kompartimentierung;
2. Ultrastruktur der Kern-DNS und die Art, wie diese DNS frei oder in Chromosomen integriert vorliegt;
3. die Verknüpfung von Zellteilung, Zelldifferenzierung und anderer Vorgänge im Zellzyklus;
4. die Anordnung der Gene innerhalb der Genketten.

Die meisten molekularen und biochemischen Grundstrukturen sind jedoch nach wie vor weitgehend ähnlich. Die Zukunft wird entscheiden, ob es für das Studium der Zelldifferenzierung wichtiger ist, die Übereinstimmungen oder die Unterschiede hervorzuheben.

3.5. Dictyostelium discoideum – ein zellulärer Schleimpilz

Daß Zellteilung und Zelldifferenzierung eng verknüpft sein müssen, haben wir im vorangegangenen Abschnitt als eine Schwierigkeit kennengelernt. Die enge Verknüpfung ist nicht nur ein beachtliches theoretisches Problem, sondern auch in der praktischen Arbeit unangenehm. Es ist oft schwierig zwischen solchen Vorgängen zu unterscheiden, die wirklich eine Folge der Differenzierung sind, und jenen, die aus dem Zellzyklus resultieren, vor allem dann, wenn die Vorgänge bei beiden Phänomenen gleichzeitig einsetzen. Auf Grund dessen ist der Schleimpilz besonders attraktiv, denn in seinem Lebenszyklus laufen Wachstum und Zelldifferenzierung getrennt ab. Unabhängig davon, ob man sich für diesen Organismus als Modellsystem für höhere Organismen entscheidet oder nicht, bleiben wir konsequent, denn diese Frage kann man bei jeder Reduktionsmethode stellen.

Die Amöbe *D.discoideum* findet man in bakterienreichen Bö-

den, wo sie von anderen Bodenamöben nicht zu unterscheiden ist. Sie ernährt sich von Bakterien, und wenn sie genügend Nahrung vorfindet, wächst sie weiter und teilt sich immer wieder. Wenn jedoch keine Nahrung mehr vorhanden ist und die Amöbe sich auf fester Oberfläche befindet, was beim Boden der Fall ist, ändert sie ihr Verhalten ganz auffällig. Die Amöben sammeln

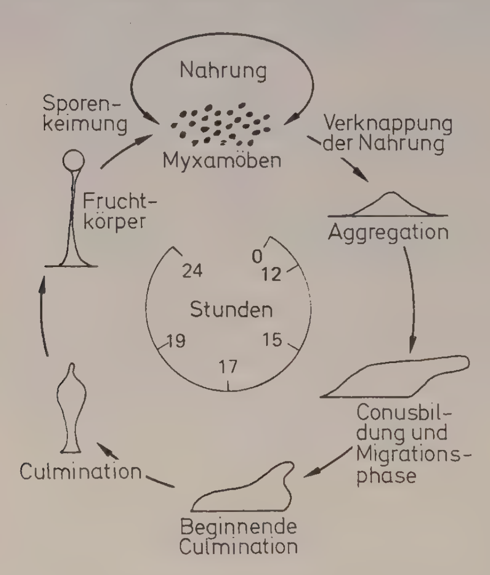


Abb. 3.11: Entwicklungszyklus der »kollektiven Amöbe« *D. discoideum.* Die Zeitangen beziehen sich auf die Entwicklung auf Millipore-Filtern. Nach [26]

sich an einem zentralen Punkt zu einem makroskopisch sichtbaren Zellhaufen (Zellaggregat). Dieser Zellhaufen sieht wie ein Gewebe aus und kann bis zu 40 000 Zellen enthalten (Aggregationsplasmodium). Die ersten Zellen, die das Aggregationszentrum erreichen, werden von den nachfolgenden in die Höhe gedrückt. So entsteht ein fingerähnliches Gebilde. Es kippt nach einer Seite um und beginnt zu wandern. Die Wanderungsphase kann unterbleiben oder, abhängig von den Umwelteinflüssen, unbestimmte Zeit andauern. Der Conus reagiert auf Licht, Feuchtigkeit und Temperatur. Auf Grund dieser Reaktionen kann man schließen, daß der Conus im Erdboden an die Oberfläche wan-

dert und dort einen Fruchtkörper bildet. Die Fruchtkörperbildung ist das Ende der Zelldifferenzierungsphase. Der Fruchtkörper besteht aus einem schlanken, zylindrischen Stiel, der aus zellulosehaltigen Stielzellen aufgebaut ist und am oberen Ende sehr viele Sporenzellen trägt. Diese Zellen sind von einer dicken Zellwand aus Polysacchariden umschlossen, die sie vor dem Austrocknen schützt. Unter natürlichen Bedingungen würde der Regen die Sporen verteilen. Bei Anwesenheit von Bakterien würden die Sporen reifen, und jede würde eine amöboide Zelle ergeben und damit den Zyklus vollenden. Diese Verbreitungsart scheint ökologisch sinnvoll zu sein. Als Modellsystem für Untersuchungen zur Zelldifferenzierung hat dieser Organismus den Vorzug, daß man die Differenzierung durch Nahrungsentzug auslösen kann. Alle Phänomene, die mit dem Wachstum zusammenhängen, treten in der vegetativen Phase auf und erschweren damit die Untersuchungen zur Differenzierung nicht. Die Zelldifferenzierung ist einfach und umfaßt nur drei Zelltypen (Abb. 3.12). Doch ist der Vorgang komplex genug, um ähnliche Grundzüge aufzuweisen, die auch die Embryogenese besitzt. Die Zellen im Conus entwickeln sich *entweder* zu Sporenzellen *oder* zu Stielzellen. Dabei sind offensichtlich Wechselwirkungen von Zelle zu Zelle beteiligt. Denn die Entscheidung, wozu sich eine Zelle entwickelt, muß zeitlich und räumlich so getroffen werden, daß sich als Ergebnis aller Einzelentscheidungen ein Fruchtkörper entwikkelt. Genau so einfach wie die zeitliche Differenzierung ist bei *D.discoideum* auch die räumliche Differenzierung [25]. Ein letztes Argument für die Untersuchung dieses Organismus ist, daß

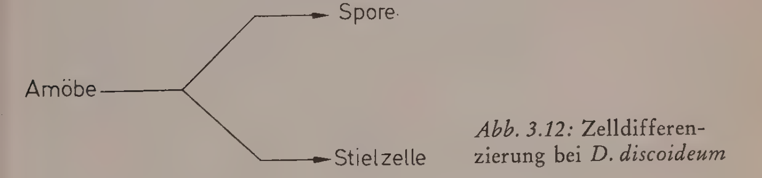


Abb. 3.12: Zelldifferenzierung bei *D. discoideum*

ein parasexuelles System genetischer Rekombination vorkommt, obwohl genetische Rekombination und Zelldifferenzierung nicht zwangsläufig miteinander verknüpft sind. Somit kann man vielleicht bei diesem Organismus erfolgreich die genetischen Methoden der Mikrobiologie für Prokaryonten anwenden, da der Schleimpilz haploid ist und nur sieben Chromosomen besitzt.

Da die Amöben haploid sind, kann man leicht Mutanten gewinnen, die wie Phagen bedingt letal sind. Am gebräuchlichsten sind temperatursensitive Mutanten. Es wurden drei Typen temperatursensitiver Mutanten beschrieben (Tabelle 3). Sie beziehen sich auf Veränderungen der Gene, die spezifisch am Wachstum (GTS) oder an der Differenzierung (DTS) beteiligt sind und auf Gene, die in beiden Phasen des Lebenszyklus beansprucht werden (TS). Man hat mit der genetischen Analyse dieser Mutanten erst begonnen und weiß noch nicht, ob sie vielleicht einer einzigen Gengruppe angehören. Doch da DTS-Mutanten vorhanden sind, wird deutlich, daß während der Differenzierung Gene aktiviert werden. Wir betrachten hier, so wie es schon bei anderen Fällen diskutiert wurde, die Zelldifferenzierung als Ergebnis einer differentiellen Genaktivität. Ein unmittelbarer Nachweis für die differentielle Aktivierung der Gene während der Differenzierung ergab sich aus den Untersuchungen über die Synthese neuer Enzyme während der Fruchtkörperbildung. Der Fruchtkörper enthält viele Polysaccharide, die in der Amöbe nicht vorhanden sind. Viele Arbeiten befaßten sich deshalb mit Enzymen, die in irgend einer Weise an der Polysaccharidsynthese beteiligt sind. Drei Beispiele für solche Enzyme: UDP-Glukose-Pyrophosphorylase, UDP-Galaktose-Polysaccharid-Transferase und Trehalose-6-Phosphat-Synthetase. In Abb. 3.13 sieht man ihren Aktivitätsverlauf während der Entwicklung von *D.discoideum*. Die UDP-Galaktose-Polysaccharid-Transferase ist an der Synthese von Mucopolysacchariden beteiligt und wahrscheinlich für das Aneinanderkleben der Sporen in der Sporenmasse verantwortlich. Trehalose ist die charakteristische Reservesubstanz der Sporen. Die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase katalysiert die Synthese der UDP-Glukose (aus UTP und Glukose-1-Phosphat). Aus ihr werden der Reihe nach andere Kohlenhydrate synthetisiert. Es leuchtet ein, daß diese Enzyme während des Verlaufs der Zelldifferenzierung synthetisiert werden müssen. Diese Schlußfolgerung wird auch dadurch unterstützt, daß der Anstieg der spezifischen Aktivität (Abb. 3.13) durch Inhibitoren der Proteinsynthese verhindert wird. Cycloheximid ist z. B. solch ein Inhibitor, der störend in die Ribosomenfunktion eingreift. Auch bei den Mutantenstämmen, die ihre Entwicklung nicht erfolgreich zu Ende führen können, verlaufen die Aktivitätskurven völlig anders als normal. Bei der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase konnte man außerdem zeigen, daß parallel zum Anstieg der spezifi-

schen Aktivität immer mehr immunologisch aktives Protein vorhanden ist. Der Nachweis wurde durch Antikörper für gereinigte UDP-Glukose-Pyrophosphorylase erbracht. Deshalb stellt der Anstieg, wie er in Abb. 3.13 dargestellt ist, eine echte *de novo* Synthese der beteiligten Enzyme dar. Die genannten Kriterien reichen aus, diese Enzyme als »entwicklungsregulierte Enzyme« zu betrachten. Bei vielen anderen Enzymsynthesen kann man nur vermuten, daß sie durch die Entwicklung reguliert werden. Aber auch bei den genannten Beispielen ist es nicht sicher, ob die Kriterien ausreichen. Seit kurzem kann man die Amöben auf verschiedenen Medien wachsen lassen und damit ihre chemische und enzymatische Zusammensetzung auf verschiedenste Weise beeinflussen. Die Untersuchung der darauf folgenden Differenzierung dieser Amöben ergab, daß Veränderungen im Syntheseverlauf einiger Enzyme erfolgen können, die wahrscheinlich durch die Entwicklung reguliert werden. Veränderte Medien rufen jedoch bei der Synthese der drei Enzyme in Abb. 3.13 keine Veränderungen hervor. Hier scheint deshalb die Korrelation von Enzymsynthese und Entwicklungsstadium zuzutreffen. Man kann nicht immer ohne weiteres die Ereignisse, die notwendigerweise an der Differenzierung beteiligt sind, von solchen unterscheiden, die nicht unmittelbar damit zusammenhängen. Erstere sind Voraus-

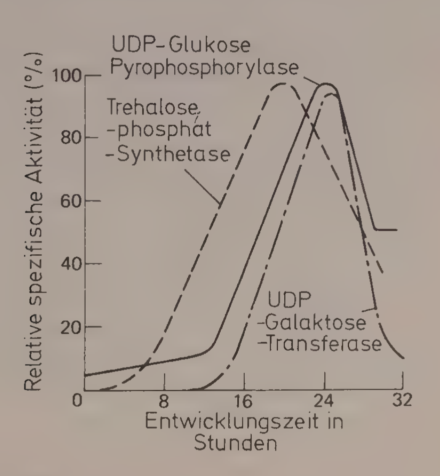


Abb. 3.13: Enzymsynthese während der Zelldifferenzierung bei der Amöbe *D. discoideum*

setzungen für die laufenden Veränderungen der Morphologie, die die Zelldifferenzierung ausmachen. Letztere ergeben sich aus der veränderten Umwelt und aus Wechselwirkungen, denen die Zellen durch die Morphogenese ausgesetzt sind. Mit anderen Worten, Ursache und Wirkung sind nicht immer leicht zu unterscheiden.

Tab. 3: Temperatursensitive Mutanten von *D.discoideum* (nach Loomis)

Stamm*	Wachstum bei 27°	Differenzierung bei 27°
Wildtyp	+	+
GTS	–	+
DTS	+	–
TS	–	–

* Alle Stämme wachsen und differenzieren normalerweise bei 22°

Man hat die Wirkung von Transkriptions-Inhibitoren, z. B. von Actinomycin D auf das Auftreten der genannten Enzyme untersucht, und fand heraus, daß in allen drei Fällen einige Zeit vor dem Anstieg der Enzymaktivität unbedingt ein spezifisches RNS-Molekül synthetisiert werden muß. Man ist geneigt, darin das mRNS-Molekül für das entsprechende Enzym zu sehen. Wie in vielen anderen Fällen, wo ähnliche Untersuchungen über die Effekte von Inhibitoren auf die Enzymsynthese durchgeführt wurden, könnten dies sehr wohl alles nur Voraussetzungen für ein RNS-Molekül sein. Es könnte sich genau so um einen Bestandteil der Ribosomen handeln oder um ein Transkriptionsprodukt, das irgendwie an der Stabilisierung oder am Transport der mRNS beteiligt ist, wie um das spezifische mRNS-Molekül selbst. Bei diesen Untersuchungen ist bemerkenswert, daß es in allen drei Fällen verschiedene Phasen der Empfindlichkeit in Bezug auf Actinomycin D gibt (Abb. 3.14). Daher müssen Regulatormechanismen vorhanden sein, die während der Proteinsynthese erst nach der Transkription wirksam werden.

Diese Experimente sind eigentlich Titrationsexperimente. Dabei wird die Enzymaktivität, die nach der Zugabe von Actinomycin D auftritt, als Maß der spezifischen RNS-Synthese verwendet, ehe man Actinomycin D hinzugefügt hatte. Solche Ex-

perimente gelingen nur, wenn eine strenge arithmetische Beziehung zwischen RNS und Protein besteht. Ohne diese Beziehung könnten die Zellen ihre Unterproduktion an RNS durch effektiveren Einsatz der wenigen RNS-Moleküle kompensieren, die sie zum Zeitpunkt der Antibiotikazugabe bereits besitzen. Wir wissen nichts darüber, wie diese Kontrollen wirken könnten.

Von allgemeinem Interesse ist bei diesen Experimenten, daß die Zugabe von Actinomycin D nach mehr als 16 Stunden nicht

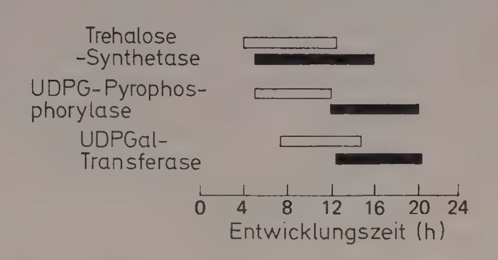


Abb. 3.14: Transkriptions- (□) und Translationsperioden (■) bei der Bildung von drei Enzymen während der Zelldifferenzierung von *D. discoideum*

nur 100 %, sondern nach übereinstimmenden Ergebnissen eine noch höhere Enzymaktivität ergibt. Diesen »paradoxen« Effekt durch Actinomycin D fand man auch in einigen anderen Systemen bei ähnlichen Experimenten. Damit wird deutlich, daß der Verlust einer Enzymaktivität auch von der vorhergehenden Synthese einer spezifischen RNS abhängt. Der Verlust einer Funktion ist wahrscheinlich ein ebenso wichtiges und kontrolliertes Ereignis, wie es der Erwerb dieser Funktion ist.

Bei den Schleimpilzen scheint die Situation ähnlich zu sein wie bei den zuvor besprochenen Prokaryonten. Eine verwickelte Folge morphogenetischer Abläufe wird auf molekularer und biochemischer Ebene durch eine ganze Reihe von Transkriptions- und Translationskontrollen gesteuert. Gegen diese Interpretation wurden Einwände erhoben. Doch ist es interessant, wie grundverschieden das Geschehen, das in Abb. 3.12 dargestellt ist, interpretiert werden kann.

Zur ersten Stufe des Lebenszyklus, der Aggregation (Abb. 3.11), gehört die chemotaktische Bewegung der Zellen auf einen zentralen Punkt zu. Diese Bewegung zum Aggregationszentrum

hin wird durch ausgeschiedenes cAMP verursacht, das im Medium einen Gradienten ausbildet [27]. Wenn die Amöben auf einen Agar mit hoher cAMP Konzentration übertragen werden und die Zelldichte so gering ist, daß keine Aggregate entstehen können, werden die isolierten Einzelzellen zu stielzellenähnlichen Zellen [28]. Man behauptet, daß dieser Vorgang unempfindlich gegenüber Cycloheximid und Actinomycin D ist. cAMP kann also den Stoffwechsel der Amöben so beeinflussen, daß sie Stielzellen bilden können, ohne dabei neue Enzyme zu synthetisieren. Differenzierungsspezifische genetische Information würde daher nur für die Bildung von Sporen und (vermutlich) für die Determination der genauen Morphogenese notwendig sein.

Wright und Mitarbeiter arbeiteten intensiv an dem Problem [29]. Sie wiesen darauf hin, daß die übliche Art, eine *de novo* Enzymsynthese nachzuweisen, angezweifelt werden kann. Dies gilt besonders dann, wenn ein erhöhter Stoffwechsel innerhalb einiger Biosynthesewege notwendig wird, und sich die Zellfunktion verändert. Sie hielten die bisherigen Aussagen nur für gültig, wenn die Konzentration der Enzyme begrenzender Parameter für die gesamte Stoffwechselrate ist. In der Zelle liegen die Enzymkonzentrationen normalerweise in der Größenordnung von 10^{-5}M. (Dies gilt auch für die Enzyme in Abb. 3.13.) Die Konzentration der Substrate und Stoffwechselprodukte liegen in der Regel auch in diesem Bereich. Dies müßte zutreffen, denn der begrenzende Faktor im Umsatz des Gesamtstoffwechsels ist die Enzymaktivität, die vom Substrat kontrolliert wird, oder ganz allgemein die Konzentration der Stoffwechselprodukte. Davon ausgehend hat Wright eine Theorie zur Kinetik der Zelldifferenzierung vorgeschlagen. Sie erklärt die Synthese neuer Kohlenhydrate während der Zelldifferenzierung damit, daß in verschiedenen Zeitabschnitten die Größe der Pools weniger Schlüsselsubstanzen des Stoffwechsels verändert wird. Nahrungsmangel und cAMP kontrollieren die Differenzierung, indem sie eine zeitabhängige Folge von Änderungen der Poolgröße einleiten. Veränderte Transkriptions- und Translationskontrollen sind jetzt Folge und nicht Ursache der Veränderungen im Stoffwechsel. Beide Kontrollmechanismen scheinen bei der Regulation mitzuwirken [26]. Aber weder der eine noch der andere liefert allein eine gültige »Erklärung« für die Zelldifferenzierung. Viel eher muß es Wechselwirkungen zwischen den Kontrollmechanismen geben, die auf der Ebene der Enzymkonzentration und der Enzymakti-

vität wirksam werden. Die Schwierigkeit ist nur, ein System zu finden, mit dem man diese Wechselwirkungen untersuchen kann. Das gesamte Problem wurde kürzlich in einer Arbeit über die Kontrolle der Trehalosesynthese aufgezeigt. Bei diesem Experiment ließ man einen Teil der Amöben mit, einen Teil ohne Glukose wachsen. Der Glukosegehalt des Mediums kann bekanntlich

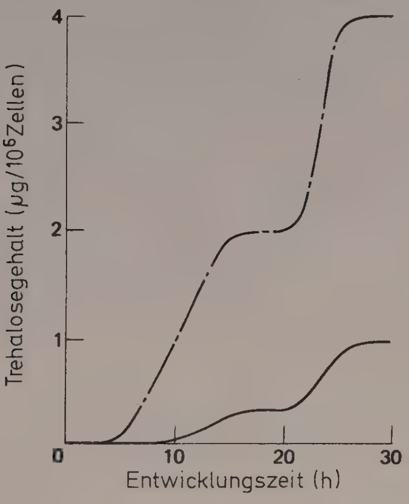


Abb. 3.15

den Glykogengehalt der Amöben beeinflussen. Man hat die Trehalosemenge gemessen, die in jedem Versuchsansatz von den Amöben während ihrer Differenzierung synthetisiert wurde. Der Glykogenspiegel bei Versuchsbeginn scheint die Differenzierung wenig zu beeinflussen. In den beiden Versuchsansätzen war die Trehalosemenge recht unterschiedlich (Abb. 3.15). Gleichzeitig wurden Trehalose-6-Phosphat-Synthetase, Trehalase (die Trehalose abbaut), und einige andere Stoffwechselprodukte gemessen. Ihr Enzymgehalt war in beiden Ansätzen gleich. Der Glukose-6-Phosphatspiegel und der UDP-Glukosespiegel waren jedoch nicht gleich. Dies ließ sich mit der Theorie zur Kinetik nicht vereinbaren [29]. Selbstverständlich wird die von den Zellen gebildete Trehalosemenge durch die Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthetase kontrolliert. Ebenso wenig wird die Enzym-

konzentration in der Zelle durch die Intensität kontrolliert, mit der das Enzym bei der Trehalosesynthese genutzt wird. Wir müssen auf die Faktoren zurückkommen, die abgesehen von den Veränderungen der Stoffwechselrate, auch später die Enzymaktivität regulieren könnten (Abschnitt 4.6).

Die Ausführungen über den zellulären Schleimpilz haben folgendes deutlich gemacht:

1. Für die Zelldifferenzierung ist der Verlust einer Funktion ebenso wichtig wie der Beginn einer neuen Funktion.
2. Transkriptions- und Translationskontrollen sind bei der Differenzierung der Eukaryonten ebenso bedeutend wie bei den Prokaryonten.
3. Es gibt wichtige Kontrollelemente, die auf die Enzymaktivität wirken. Diese Enzyme sind für den Stoffwechsel der Differenzierung von großer Bedeutung.
4. Zwischen den Kontrollelementen, die auf verschiedenen Ebenen wirksam sind, scheint es keine leicht durchschaubaren Beziehungen zu geben. Bei der Zelldifferenzierung liegt das Hauptproblem wahrscheinlich in den Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kontrollebenen.

3.6. Zellen in Gewebekultur

Man kann zahlreiche Gewebe von erwachsenen Organismen (oder besser von Embryonen) durch die Inkubation mit proteolytischen Enzymen, wie z. B. Trypsin, in Einzelzellen zerlegen. Im entsprechenden Medium werden sich solche Zellen oft teilen. In der Regel gehen die meisten Zellen nach 60–90 Teilungen zu Grunde. In den kultivierten Zellen verändern sich in dieser Zeit die Chromosomen und/oder die Chromosomenzahl. Die »anormalen« Zellen können sich mehr oder weniger unbegrenzt teilen. Dies wurde so interpretiert, als ob jede Zelle in einem Organismus eine begrenzte Lebensdauer besitzt, und als ob der Tod der Zelle unvermeidlich und vorprogrammiert ist. Die exakten physiologischen Bedingungen der Zellen im lebenden Organismus sind unbekannt und deshalb nicht nachzuahmen. Daß viele Primärkulturen eine »Krise« durchlaufen, kann auch nur bedeuten, daß eine uns unbekannte, aber lebensnotwendige Verbindung im Medium nicht mehr vorhanden ist. Wenn man trotzdem mit Zellkulturen arbeiten kann, ist dies eher der Anpassungsfähigkeit der lebenden Zellen als unserem Können zuzuschreiben. Kürzlich

wurde über Zellen berichtet, die in Gewebekultur unbegrenzt wuchsen und keine »Krise« durchmachten und dabei noch einen normalen Chromosomensatz besaßen [30]. Die Arbeiten mit Zellkulturen haben in der Vergangenheit genügend Beispiele geliefert, bei denen die Beobachtungen und Schlußfolgerungen allein einem unzureichenden Medium zuzuschreiben waren. So glaubte man, daß man differenzierte Zellen nicht kultivieren könnte, und daß sich Zelldifferenzierung und Zellwachstum bei den höheren Organismen gegenseitig ausschließen würden, wie es bei den zellulären Schleimpilzen der Fall ist. Zu dieser Auffassung war man gelangt, weil die einzigen Zellen, die die Teilungskrise überstanden, »undifferenzierte« Fibroblasten waren. Heute aber wissen wir, daß solche Zellen in Bezug auf Nährstoffe weniger anspruchsvoll sind als die meisten differenzierten Zellen, und deshalb werden sie in einem unzureichenden Medium ausselektioniert. Wenn entsprechende Medien angeboten werden, kann man aus einer Varietät differenzierter Zellen, einschließlich Muskeln [31] und Knorpeln [32], einen Klon und eine Gewebekultur erhalten. In solch einem Medium führen die Zellen ihre differenzierten Funktionen durch. Bei Zellkulturen aus embryonalem Knorpel ist eine besondere Fraktion des Flüssigextraktes aus dem ganzen Embryo nötig, um Zellkulturen mit Knorpel zu erhalten, die weitere Knorpelzellen hervorbringen. Eine andere Fraktion des embryonalen Extraktes würde das Wachstum solcher Kulturen verhindern. Es ist jedoch richtig, daß viele seit langem kultivierte Zellinien wenigstens aberrante Chromosomen besitzen, und daß der Zelltod tatsächlich ein normaler, vorbestimmter Vorgang ist. Untersuchungen zur Zelldifferenzierung bei Zellen in Gewebekultur besitzen nur Modellcharakter. Sie geben nicht die Situation in der Natur wieder.

Zellkulturen bieten unwahrscheinlich viele technische Vorteile. Sie ermöglichen prinzipiell die Anwendung mikrobiologischer Techniken bei Säugetierzellen. Sie haben gegenüber anderen Systemen, wie dem des Schleimpilzes, den Vorteil, daß man bei ihnen die Zusammenhänge zwischen Wachstum und Zelldifferenzierung untersuchen kann. Nicht zuletzt sind sie ein zutreffenderes Modell für die embryonale Zelle. In einigen Fällen konnte man Systeme finden, die der β-Galaktosidaseinduktion bei *E.coli K12* bemerkenswert ähnlich sind.

Tomkins und seine Mitarbeiter experimentierten mit einer Zelllinie von Ratten. Die Linie wurde aus einem Lebertumor gewon-

nen. Bei diesen Zellen hängt die Synthese des Enzyms Tyrosin-Transaminase von der Zugabe und dauernden Anwesenheit eines Corticosteroids ab. Das Steroid wirkt bei dem Enzym als Induktor. Jedoch scheint es grundlegende Unterschiede zwischen der Wirkungsweise des Induktors beim lac-Operon und dem Corticosteroid in der Leberzelle zu geben. Nach den Vorstellungen von Tomkins kontrolliert das Corticosteroid die Aktivität eines Strukturgens nicht auf der Transkriptionsebene (Abb. 3.16, GS), sondern es kontrolliert die Stabilität der mRNS auf dem Niveau der Translation [33]. Demnach synthetisiert die Zelle ununterbrochen mRNS für Tyrosin-Transaminase und für ein Repressorprotein (Abb. 3.16, R). Ohne Induktor verbindet sich der Repressor mit der mRNS für Tyrosin-Transaminase. Er verhindert damit die Translation und beschleunigt den Abbau der mRNS. Die Induktoren verhindern diese Verbindung von mRNS und Repressor und lösen bereits gebildete Komplexe wieder auf. Die mRNS ist nun frei für die Translation zu Tyrosin-Transaminase an den Polysomen im Zytoplasma. Diese Theorie beruht weitgehend auf einer Analyse des Effekts von Actinomycin D auf die Enzyminduktion. Actinomycin D ruft in diesem System eine Anzahl »paradoxer« Effekte hervor. Es verursacht die »Superinduktion« im Beisein von Induktoren und verzögert den Rückgang der Enzymsyntheserate. Er tritt normalerweise ein, wenn der Induktor entfernt wird. Diese Effekte kann man mit dem Modell in Abb. 3.16 erklären, weil die Repressorsynthese (R) auch auf Actinomycin D anspricht. Man nimmt an, daß es einen großen Pool mit Komplexen aus mRNS und Repressoren gibt. Wenn diese Komplexe gespalten werden, wird mRNS frei. Sie

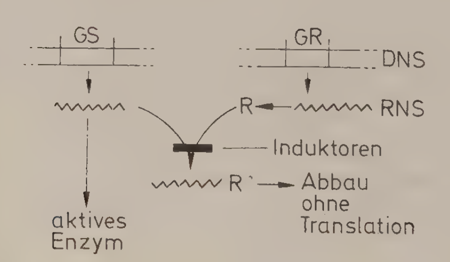


Abb. 3.16: Kontrolle der Synthese von Tyrosin-Transaminase in Leberzellen. R = Repressorprotein. Nach [33]

verursacht die »paradoxen« Effekte von Actinomycin D (vgl. S. 33).

Der Nachteil dieser Theorie besteht darin, daß sehr viele Schlußfolgerungen, direkte und indirekte, aus den Effekten durch Actinomycin D gezogen wurden. Man kann nicht sicher sein, ob ein Antibiotikum mit hemmender Funktion keine unvorhergesehenen Nebeneffekte auslöst. Sie könnten Schlüsse verfälschen, die aus der Verwendung des Inhibitors gezogen wurden. Actinomycin D ist ein lipophiles Molekül und geht deshalb mit Membranen eine enge Bindung ein. Die Schlußfolgerungen, die sich aus der Verwendung dieses Inhibitors ergeben, muß man deshalb kritisch betrachten. Viele der Tomkins'schen Beobachtungen könnte man auch mit einem anderen Effekt von Actinomycin D erklären, nämlich mit dem Abbau der Tyrosin-Transaminase [34].

Die von Tomkins eingesetzten Hepatomazellen können in Zellkulturen synchron wachsen. Untersuchungen der Induktion von Tyrosin-Transaminase in verschiedenen Abschnitten des Zellzyklus (Abb. 3.10) haben gezeigt, daß die Induktion nur dann erfolgt, wenn man in der späten G1- und S-Phase Corticosteroide zufügt. Während der G2-Phase, der Mitose und der frühen G1-Phase scheint die Transkription sowohl bei GS als auch bei GR blockiert zu sein (Abb. 3.16). Zuvor induzierte Zellen können ihre Enzymsynthese während dieser Phasen fortsetzen.

Um dieses Regulationsmodell zu bestätigen, müßten die entsprechenden Mutanten isoliert und charakterisiert werden. Leider ist es sehr schwierig, brauchbare Selektionsmethoden für solche Mutanten, die erwartungsgemäß sehr selten sind, zu finden, da die Medien für Gewebekultur in ihrer Zusammensetzung sehr komplex sind. Auch wenn man die gewünschten Regulatormutanten erhielte, ergibt sich als weitere Schwierigkeit, daß man eine genetische Analyse daran noch nicht durchführen kann. Gewebezellen besitzen in der Regel keinerlei genetische Rekombination, und es ist unwahrscheinlich, daß man ein Paarungssystem findet. Solch ein System wäre für den Gesamtorganismus tatsächlich sehr unheilvoll. Die Schwierigkeit kann man neuerdings durch Zellfusionen umgehen. Sie wird durch Viruspartikel ausgelöst, und man erhält mehrkernige Zellen. Das Sendaivirus erwies sich bei diesen Versuchen als besonders brauchbar. (Sendaiviren verursachen Influenza und wurden zuerst in Japan isoliert.) Die Viren werden mit UV-Licht inaktiviert. Dadurch sind sie nicht-

letal für die Gewebezellen. Dann werden die Gewebekulturen damit inkubiert. Die Viren fördern die zufälligen Fusionen und schaffen so vielkernige Zellen. Das Schicksal dieser Heterokaryonten hängt weitgehend von der Natur der Zellen ab, die an der Fusion beteiligt waren. Unter günstigen Umständen kann man aus diesen Heterokaryonten hybride Zellinien erhalten. Die jetzt einkernige Zelle kann Chromosomen oder Chromosomenmaterial von mehr als einem Kern enthalten. In Hybridzellen mit unterschiedlichem Genotyp findet genetische Rekombination statt. Damit konnte man eine Reihe von Genen auf verschiedenen Chromosomen lokalisieren. Das Verfahren entspricht weitgehend der Bakteriengenetik. Verbesserte Techniken eröffnen hier großartige Möglichkeiten.

Folgender nicht unbegründeter Sachverhalt zeigt, wie problematisch Zellfusionen für das Studium der Zelldifferenzierung bei Gewebekulturen sind. Wenn nämlich zwei differenzierte Zellen miteinander verschmolzen werden, verliert der Heterokaryont in der Regel rasch die jeweils unterschiedlichen Funktionen. Dies gilt besonders dann, wenn diese Funktionen zytoplasmatische Organellen betreffen. Inzwischen kann man auch einige Funktionen der differenzierten Zellen in der Hybridzelle nach der Fusion aufrecht erhalten [35]. Es scheint keinen Grund zu geben, warum diese Technik sich für das Studium der Zelldifferenzierung nicht genauso eignen sollte, wie sich die Bakteriengenetik für die Untersuchungen zur Kontrolle der β-Galaktosidasesynthese bei *E.coli* eignete.

Die Untersuchungen an Gewebekulturen sind ein Versuch, technische Möglichkeiten der Mikrobiologie auf die komplexen Vorgänge der Zelldifferenzierung, wie man sie von vielzelligen Organismen kennt, anzuwenden. Solche Versuche waren bisher nicht sehr erfolgreich, aber sie haben folgendes gezeigt:

1. In einigen Fällen sind die Kontrollmechanismen *nach* der Transkription entscheidend.
2. Bei Zellen in Gewebekultur lassen sich genetische Analysen durchführen.

3.7. Metamorphosen

Die Umwandlung von der Kaulquappe zum Frosch oder von der Raupe zum Schmetterling verläuft in vieler Hinsicht analog zur Embryonalentwicklung. Bei diesen Lebewesen scheint es, als

ob die normale Embryonalentwicklung durch den Einschub eines verlängerten Larvenstadiums mit freilebenden Larven in zwei Phasen getrennt worden wäre. Wenn die Analogie zutrifft, dann sollten die Untersuchungen über die Kontrolle der Metamorphose uns auch einen Einblick in die Regulationsmechanismen der Embryogenese gewähren. Außerdem ist es viel leichter, mit Larven als mit Embryonen zu experimentieren.

Die Metamorphosen der Insekten und Amphibien haben viele Ähnlichkeiten. Beide Vorgänge werden durch Hormone eingeleitet. Sie sind bei den Insekten von Ecdyson und bei den Amphibien von Thyroidhormon abhängig. Man kann sie von reinen Anpassungsvorgängen unterscheiden, weil sie *in anticipation* einer Umweltveränderung begonnen und häufig auch beendet werden. Die Metamorphose löst also durch hormonelle Signale ein Differenzierungsprogramm aus, das in den Zellen bereits im Embryonalstadium determiniert wurde. Man kann hier den Zeitpunkt der Determination von dem der Differenzierung außergewöhnlich gut unterscheiden. Hadorn hat diese Tatsache ausgenutzt, um bei *Drosophila* Eigenschaft und Stabilität der Determination zu untersuchen [36]. Bei den Larven treten die Zellen, die beim erwachsenen Tier die Strukturen ausbilden, in Zellgruppen – den Imaginalscheiben – in Erscheinung. Diese Zellen haben im Larvenstadium offenbar keine Funktion. Mehrere Imaginalscheiben sind im Larvenkörper verteilt. Während der Verpuppung entwickeln sich die Zellen der Imaginalscheiben zu den »erwachsenen Strukturen«, und zur gleichen Zeit werden die larvalen Strukturen abgebaut.

Auch bei den Amphibien kann man einen ähnlichen Abbau der Larvenstruktur und die Entwicklung der adulten Gewebe beobachten. Das beeindruckendste Beispiel für vorprogrammierten Gewebeabbau ist die Rückbildung des Kaulquappenschwanzes. Man weiß, daß dieser Vorgang von der vorhergehenden Induktion neuer, abbauender Enzyme abhängt. Die Induktion aktiviert der Reihe nach ganz bestimmte Gene, deren Aufgabe es ist, Zellen zu zerstören. Man darf auf keinen Fall unterschätzen, wie wichtig der Verlust von Funktionen und Strukturen in allen Modellen zur Differenzierung ist.

Wenn die Kaulquappe vom Wasser- zum teilweisen Landleben übergeht, verlangt dies bei der Metamorphose einen grundlegenden Neuaufbau des Stickstoffhaushaltes. Besonders die Enzyme des Harnstoffzyklus müssen von den Leberzellen *de novo* syn-

thetisiert werden. Dieser Vorgang wird durch Thyroidhormone induziert [37]. Er schließt nicht nur die Synthese von ribosomaler und anderer DNS ein, sondern auch die Synthese von Phospholipiden und weiteren Bestandteilen der Membranen. In diesem Fall ist die Verbindung von Proteinbiosynthese und Membranbildung besonders eng und eindrucksvoll. Unmittelbar bevor in den Leberzellen die Enzyme des Harnstoffzyklus auftreten, werden sehr viele Ribosomen neu synthetisiert. Sie sind eng an die Membranen des endoplasmatischen Reticulums (ER) gebunden. Da an dieser Stelle vom Stoffwechsel gleichzeitig sehr viele Phospholipide angeliefert werden, werden die neuen Ribosomen wahrscheinlich an die neuen Membranen assoziiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen in diesem Stadium haben bestätigt, daß die Ribosomen zunächst als einfache vesikuläre Strukturen vorliegen, die allmählich zu einem komplexen System, der Doppellamelle, werden. Die Doppellamelle tritt zuerst im kernnahen Bereich auf. Der veränderte RNS- und Phospholipidstoffwechsel stellt in der Tat die sichtbare Absonderung von Polysomen an den neuen Membranen dar. Dieser Tatbestand wurde auch dadurch untermauert, daß gleichzeitig mit den neuen Membranstrukturen Mitochondrien mit schwach entwickelten Cristae auftreten. Diese enthalten nach histologischen Untersuchungen das Enzym Carbamylphosphat-Synthetase, das am Harnstoffzyklus beteiligt ist.

Die Insekten- und Amphibienmetamorphose ist damit das komplexeste und vollständigste Modellsystem, das man sich für die embryonale Zelldifferenzierung vorstellen kann.

1. Diese Untersuchungen bieten das bisher beste Beispiel, bei dem man Determination und Differenzierung deutlich auseinander halten kann.
2. Sie unterstreichen die Schlüsselrolle der Hormone als Kontrollmechanismen.
3. Für die Wechselwirkungen von molekularen/biochemischen Vorgängen und zytologischen Veränderungen sind diese Untersuchungen bis heute das beste Beispiel.

Literatur

1. Brenner, S., Jacob, F. and Meselson, M.: Nature, 190, 576–580 (1961)
2. Wood, W. B. and Berg, P.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 48, 94–104 (1962)

3. Burgess, R. P., Travers, A. A., Dunn, J. J. and Bautz, E. K. F.: Nature, 221, 43–47 (1969)
4. Bautz, E. K. F., Bautz, F. A. and Dunn, J. J.: Nature, 223, 1022–1024 (1970)
5. Travers, A. A.: Nature, 229, 69–71 (1971)
6. Cohen, S. S.: Virus Induced Enzymes, Columbia University Press, New York (1968)
7. Levine, M.: Ann. Rev. Gen., 3, 323–342 (1969)
8. Beckwith, J. and Zipser, D.: The Lac Operon, Cold Spring Harbour Laboratory, New York (1970)
9. Jacob, F. and Monod, J.: J. Mol. Biol. 3, 318–356 (1961)
10. Woods, R. A.: Biochemical Genetics, Chapman and Hall, London (1973)
11. Lewin, B. M.: The Molecular Basis of Gene Expression, J. Wiley and Son, London (1970)
12. Monod, J. and Jacob, F.: Cold Spring Harbour Symp. 26, 389–401 (1961)
13. Mitchinson, J. M.: The Biology of the Cell Cycle, Cambridge University Press, Cambridge (1971)
14. Losick, R. and Sonensheim, A. L.: Nature, 224, 35–37 (1969)
15. Sadoff, H. L., Celikol, E. and Engelbreckt, H. L.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 66, 844–849 (1970)
16. Mandelstam, J.: Symp. Soc. Exp. Biol., 25, 1–26 (1971)
17. Szjulmajster, J.: Symp. Soc. gen. Microbiol., 23, 45–83 (1973)
18. Novikoff, A. B. and Holtzmann, E.: Cells and Organelles, Holt, Reinhard and Winston, New York (1971)
19. Davis, M.: Functions of Biological Membranes, Chapman and Hall, London (1973)
20. See articles by Carr, N. G., Dworkin, M. and Hopwood, D. A.: Symp. Soc. gen. Microbiol., 23 (1973)
21. Ohno, S.: Evolution by Gene Duplication, Allen and Unwin, London (1970)
22. Southern, E. M.: Nature, 227, 794–798 (1970)
23. Gall, J. G. and Pardue, M. L.: Science, 168, 1356–1358 (1970)
24. Britten, R. J. and Kohne, D. E.: Science, 161, 529–540 (1968)
25. Garrod, D. J. and Ashworth, J. M.: Symp. Soc. gen. Microbiol., 23, 407–427 (1973)
26. Quance, J. and Ashworth, J. M.: Biochem. J., 126, 609–615 (1972)
27. Bonner, J. T.: Ann. Rev. Microbiol., 25, 75–92 (1972)
28. Bonner, J. T.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 65, 110–113 (1972)
29. Wright, B. E.: Science, 153, 830–837 (1966)
30. Moore, G. E. and McLimans, W. F.: J. Theoret. Biol., 20, 217–226 (1968)
31. Konigsberg, I. R.: Science, 140, 1273–1284 (1963)
32. Coon, H. G.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 55, 66–73 (1966)

33. Tomkins, G. M.:, Gelehrter, T. D., Martin, D., Samuels, H. H. and Thompson, E. B.: Science, 166, 1474–1480 (1966)
34. Reel, J. R. and Kenney, F. T.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 61, 200–206 (1968)
35. Harris, H.: Cell Fusion, Oxford University Press, Oxford (1969)
36. Hadorn, E.: In Major Problems in Developmental Biology, Academic Press: New York, pp. 85–104 (1967)
37. Tata, J. R.: Symp. Soc. Exp. Biol., 25, 163–182 (1971)

4. Spezielle Systeme – Probleme der Zelldifferenzierung aus klassischer Sicht

In den bisherigen Abschnitten ging man mehr oder weniger deutlich davon aus, daß die Zelldifferenzierung eigentlich ein Problem der differentiellen Genaktivität ist: In verschiedenen Zellen sind verschiedene Gene aktiv, doch alle Zellen besitzen dieselbe genetische Information. Bei den Phagen, der Sporulation und Sporenreifung der Bakterien besteht das Modellsystem aus einer Zelle, und das Problem liegt eindeutig bei den zeitabhängigen Veränderungen der Genaktivität. Doch bei vielzelligen und besonders bei embryonalen Systemen ist dies nicht so eindeutig. So wies Weismann bereits im 19. Jahrhundert darauf hin, daß für die Unterschiede zwischen den Embryonalzellen eigentlich die unterschiedlichen »Nukleoplasmen«, wie er es nannte, verantwortlich seien. Er schlug eine sehr einfache Hypothese vor: ›Bei jeder Kernteilung teilt sich dessen spezifische Substanz in zwei Hälften von unterschiedlicher Qualität, so daß auch die Zellkörper transformiert werden‹. Von einer derartigen Aufteilung der Gene auf die Zellen des Embryos dürfen die Keimzellen nicht betroffen werden. Weismanns Theorie verlangt also eine qualitative Unterscheidung zwischen somatischen Zellen und Keimzellen. In ihrer ursprünglichen Form bestand die Theorie nicht lange, doch darf sie für sich beanspruchen, eine der wichtigsten Theorien zur Embryonalentwicklung zu sein, da sie Anregung zu einer ganzen Reihe klassischer Arbeiten in der Embryologie war. In der »master-slave« Hypothese von Callan ist sie gewissermaßen noch erhalten (vgl. Abschnitt 4.1.1), wenn auch in stark abgewandelter Form. Barth hat in ganz hervorragender

Weise solche Versuche beschrieben, die Weismanns Theorie beweisen oder widerlegen [1]. Er bespricht die Transplantationsexperimente, mit denen bewiesen wurde, daß ausdifferenzierte Zellen sämtliche Gene enthalten. Bei diesen Experimenten wird die Tatsache genutzt, daß Amphibieneier sehr groß sind. Man kann nämlich Kerne und andere Stoffe relativ leicht in ihr Zytoplasma injezieren und die Folgen solcher Behandlungen für die Entwicklung beobachten. Das überzeugendste dieser Experimente stammt von Gurdon. Er injezierte einen diploiden Kern aus einer Darmzelle des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* in ein Ei des Frosches. Den Kern der Eizelle hatte er zuvor inaktiviert. Der transplantierte Kern löst die normale Entwicklung des Eies aus. In einigen Fällen entstehen sogar ausgewachsene, fortpflanzungsfähige Frösche. Diese Versuche zeigen, daß differenzierte Zellen ein vollständiges Genom haben. Ähnliche Experimente wie die von Gurdon wurden zuvor von Briggs und King mit einem anderen Frosch *(Rana)* durchgeführt. Leider hatten sie nicht dieselben Ergebnisse wie Gurdon. Dauerhafte und irreversible Veränderungen des Nukleoplasmas, wie Weismann es nannte, sind deshalb nicht ganz auszuschließen. Obgleich genaue Messungen des DNS-Gehaltes diploider Zellen gezeigt haben, daß Zellen in den meisten Geweben der adulten Organismen gleich viel DNS besitzen, kennt man auch gegenteilige Fälle (siehe Abschnitt 4.1.2). Im Augenblick scheint es jedoch sinnvoller zu sein, von Gurdons Ergebnissen auszugehen. Die Versuche von Briggs und King sind die Ausnahme der Regel, daß alle Zellen eines Lebewesens dieselbe genetische Information besitzen und sich deshalb in der Aktivität und nicht in der Art ihrer Gene unterscheiden. Zu dieser Schlußfolgerung tragen auch eingehende genetische Analysen von Mutationen bei der Ontogenese höherer Organismen bei.

Bei höheren Organismen verursachen viele Letalmutationen zu einer ganz bestimmten Zeit der Entwicklung den Tod in einer spezifischen und reproduzierbaren Art und Weise. In der Regel verläuft die Entwicklung bis zu einem gewissen Punkt normal, dann entstehen charakteristische abweichende Strukturen und der Tod tritt ein. Mäuse, die im Gen »brachyrury« homozygot sind, entwickeln sich bis zum 10. oder 11. Tag normal und sterben dann auf Grund einer abartigen Differenzierung des Rückenstranges. (Brachyrury-Mutanten sind kurzschwänzig.) Aus zahlreichen Beobachtungen dieser Art ergibt sich, daß die Entwick-

lung bis zum 10. Tag normal verläuft, weil das Gen »brachyrury« bis zu diesem Zeitpunkt inaktiv ist. Am 10. Tag aktivieren Zellen des Rückenstranges das Gen. Weil das Gen mutiert ist, wird kein normales Skelett ausgebildet. Bezeichnenderweise bleiben dabei, wie bei vielen solchen Zellen, andere Zellen solange davon unbeeinflußt, bis Störungen im gesamten Organismus auftreten. Das Gen »brachyrury« ist nicht nur zu bestimmten Zeiten der Entwicklung, sondern auch nur in bestimmten Zellen aktiv, d. h. seine Aktivierung ist sowohl zeit- als auch gewebespezifisch. Sogar bei solchen Mutanten, bei denen zahlreiche Gewebe gleichzeitig betroffen zu sein scheinen (pleiotrope Mutationen), sind viele dieser Komplikationen nachweislich die Folge sekundärer Effekte einer Mutation, die in ihrem Primäreffekt gewebespezifisch ist. Zwergmutanten bei Mäusen erreichen nur $^1/_3$ der normalen Größe. Sie haben zahlreiche Störungen im Stoffwechsel und andere Anomalien. Die Stoffwechselstörungen sind eine Folge der Anomalien mehrerer endokriner Organe. Die Anomalien werden durch eine primäre Schädigung der eosinophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens verursacht, der das Wachstumshormon produziert.

Man konnte in einigen Fällen gewebespezifische Genaktivität als Ergebnis einer gewebespezifischen Proteinsynthese nachweisen. Das beste Beispiel dafür ist das von Gewebe zu Gewebe unterschiedliche Isoenzymmuster (Abschnitt 4.5). Zweifellos werden hier verschiedene Gene in verschiedenen Geweben und im selben Gewebe zu verschiedenen Entwicklungsstufen recht unterschiedlich aktiv. Das Isoenzymmuster der Lactat-Dehydrogenase aus Inzuchtlinien bei Mäusen ist ein eindrucksvolles Beispiel für die Gewebespezifität eines Regulatorgens. Mäuse vom Wildtyp besitzen in ihren Erythrocyten und in vielen anderen Geweben eine Lactat-Dehydrogenase mit Untereinheiten vom B-Typ. Jedoch haben die Mäuse, die im Gen Ldr-1 homozygot sind, keine B-Untereinheiten bei der Lactat-Dehydrogenase in ihren Erythrocyten, obwohl das Isoenzymmuster von allen anderen Geweben der Mutante dem Wildtyp entspricht. Die Ldr-1 Mutanten können also B-Untereinheiten synthetisieren. Von der Mutation ist nur ein Regulatorgen betroffen, das in den Erythrocyten aktiv ist. Eine gewebespezifische Aktivität von Struktur- und Regulatorgenen konnte man an Hand exakter Untersuchungen auch für andere Mäusestämme zeigen.

Die Genetik spielt in der Biologie die gleiche Rolle wie die

Thermodynamik in der Physik. Ihre Beobachtungen und Argumente sind eigenständig und von jeder Gen- und Mutationstheorie usw. unabhängig. Die genetischen Beobachtungen müssen mit jeder mechanistischen Theorie vereinbar sein. Die Aussagen der Genetik zur differentiellen Genaktivität stammen größtenteils aus Untersuchungen mit »Laborstämmen« von Mäusen und Ratten und auch von den Gurdon'schen Transplantationsexperimenten. Ihre Aussagekraft rechtfertigt es, sich auf Versuche zu konzentrieren, mit denen man die Genaktivierung (und Inaktivierung) zu unterschiedlichen Zeiten in verschiedenen Zellen des sich entwickelnden Embryos erfassen kann.

Die Modellsysteme in Kapitel 3 haben gezeigt, daß solche Kontrollen auf der Ebene der Transkription, der Translation und beim Abbau von Makromolekülen vorkommen. Außerdem gibt es auch Kontrollen bei Struktur und Aktivität in einzelnen Bestandteilen der Makromoleküle. Wir haben gesehen, wie eine ungewöhnliche Eigröße und meist zufällig gezüchtete Ratten- und Mäusestämme mitgeholfen haben, das Bild der differentiellen Genaktivität zu prägen. Nun müssen wir nach anderen hochspezialisierten Systemen suchen, an denen wir das Phänomen weiter untersuchen können.

4.1. Struktur und Funktion der Chromosomen

Die DNS der Eukaryontenzellen findet man in Zellorganellen – den Chromosomen. Die Chromosomen enthalten außer DNS basische Proteine (Histone), saure Proteine und RNS. Das Verhältnis von DNS : RNS : Protein ändert sich von Gewebe zu Gewebe. Die Werte der Rattenleber können als »typisch« gelten; – 1,00 DNS : 1,00 Histone : 0,67 saure Proteine : 0,043 RNS.

Abgesehen von einigen besonderen Zellen sind die Chromosomen fast während des ganzen Verlaufs des Zellzyklus nicht lichtmikroskopisch sichtbar. Sieht man sie dann bei der Teilung, sind sie kondensiert und führen keine Transkription durch. Die verschiedenen chromosomalen Bestandteile bestimmen die Struktur und regulieren die Aktivität der DNS-Moleküle. Es ist schwierig, die jeweilige Funktion dieser Bestandteile festzulegen. Vieles von dem, was wir über Struktur und Funktion der Chromosomen wissen, stammt aus Untersuchungen der außergewöhnlichen Chromosomen in Amphibienoocyten und in Speicheldrüsen der Fliegenlarven.

4.1.1. Lampenbürstenchromosomen

Die Lampenbürstenchromosomen findet man bei einer Reihe von Lebewesen in Zellen, die sich zu Eiern entwickeln können (in Oocyten). Lampenbürstenchromosomen erscheinen als haarige Fäden (Abb. 4.1), die in den Oocyten aus normalen Pachytänchromosomen entstehen. Sie bleiben während der Oocytenreifung für mehrere Monate oder Jahre erhalten und kontrahieren schließlich vor den letzten Stufen der Meiose und Eibildung zu normalen meiotischen Bivalenten. Lampenbürstenchromosomen kommen also im Diplotän der Meiose vor. Das Chromonema besteht aus zwei DNS-Doppelhelices. Die Chromomeren stellen Abschnitte entlang des Chromosoms dar, wo die DNS in mehrfach gewundener Form (supercoiled) vorliegt. (Chromomeren werden so genannt, weil sie von DNS-spezifischen Farbstoffen stark angefärbt werden.) Eine Schleife besteht aus einer DNS-Doppelhelix, an die auch RNS und Proteine gebunden sind. Die

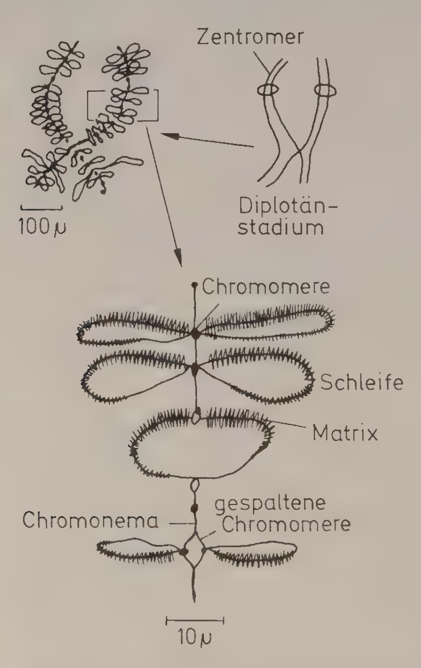


Abb. 4.1: Lampenbürstenchromosomen des Molches *Triturus viridenscens.* Nach [4]

Schleifen treten immer paarweise auf, und jede Schleife hat eine charakteristische, genetisch festgelegte Struktur. Wegen der Proteinmatrix, die die Schleifen besitzen, kann man sie sehen, ohne sie färben zu müssen. An beiden Schleifenenden befindet sich nicht gleich viel Matrix. Wenn man zu den Oocyten Actinomycin D zugibt, wird die Matrix von der Schleife losgelöst, und die nackte DNS-Fibrille fällt auf das Chromomer. Gibt man nun, nachdem das Actinomycin D ausgewaschen wurde, kurzfristig radioaktives Uridin zu, erscheint die Markierung zuerst an dem Schleifenende, an dem die Matrix am dünnsten war. Die Schleife bildet sich neu aus, und gleichzeitig erscheint darauf die Markierung. Demnach wird die DNS von einer Seite der Chromomere ausgehend »aufgespannt«. Sie synthetisiert RNS und bekommt eine Proteinhülle, wenn sie die Schleife durchwandert hat und schließlich auf der anderen Seite der Chromomere wieder »eingeflochten« wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben diese Interpretation der Lampenbürstenchromosomen bestätigt und ferner gezeigt, daß die Matrix eine ähnliche Struktur besitzt, wie man sie auch im Nukleolus findet (Abb. 4.6). Im Nukleolus läuft bekanntlich die ribosomale RNS-Synthese ab.

Die Chromomeren enthalten also eine mehrfach gewundene, kondensierte DNS (und daran gebundene Proteine) im inaktiven Stadium. Die Schleifen dagegen enthalten die DNS in offener, diffuser und aktiver Form.

Die gesamte DNS-Menge in einer Chromomere und ihrem Schleifenpaar entspricht ungefähr dem ganzen Genom von *E.coli* (ca. 10^{-4} g). Jedes Schleifenpaar wirkt wie eine funktionelle Einheit für die RNS-Synthese und damit auch für die Proteinsynthese. Um die Primärstruktur eines normalen Proteins festzulegen, wäre viel weniger DNS notwendig, als oben angegeben wurde. Wenn jede Schleife tatsächlich einem Gen entspräche, und Schleifenmuster wie Mendelsche Allee vererbt würden, dann gäbe es viel mehr DNS in den Schleifen und auch eine umfassendere RNS-Synthese als man eigentlich erwarten durfte. Nach Callans Vorstellungen liegen in jeder Schleife viele Kopien eines Strukturgens [3]. Dies läßt sich nur schwer mit der genetischen Vorstellung in Einklang bringen, daß auf jedem Chromosom nur ein Allel hervorgebracht wird. Ebenso unvereinbar ist die Theorie mit der Eintrefferkinetik der Mutationsforschung. Um diesen Einwänden entgegen zu treten, sagte Callan, daß nicht alle Kopien eines Gens gleichwertig sind. Nur eine einzige

Kopie, das »master Gen«, ist an der genetischen Rekombination beteiligt und stellt ein Allel im Mendelschen Sinne dar. Alle anderen Kopien des Gens, die »slave Gene«, müssen sich einem Restitutionsprozeß unterziehen. Dabei muß ihre Basensequenz genau mit der des master Gens übereinstimmen, ehe eine Transkription erfolgen kann. Auf diese Weise können Mutationen des master Gens auf die slave Gene übertragen werden und die Synthese veränderter Proteine bewirken. Treten die Mutationen jedoch in den slave Genen auf, werden sie während des Restitutionsprozesses eliminiert. Man unterscheidet also zwischen Genen, die genetische Information übertragen, und Genen, die als Matritze der genetischen Information dienen. Nach Callans Hypothese stellt eine Chromomere und eine Schleife eine Genfamilie dar. Die Schleife enthält solche slave Gene, die bei der RNS-Synthese als Matritzen notwendig sind. Das master Gen liegt in dem Teil der Chromomere, in dem die Matrix am dünnsten ist. Es kontrolliert die Basensequenz der slave Gene, bevor diese von einer Seite der Chromomere ausgehend eine Schleife ausbilden. Diese eingängige Theorie konnte bisher nicht in allen Punkten bewiesen werden. Sie gibt aber eine gute Erklärung für viele Beobachtungen an Lampenbürstenchromosomen und kann auch mit vielen Ergebnissen der Genetik bei höheren Organismen in Einklang gebracht werden. Jedoch geht diese Theorie davon aus, daß im Genom die meisten Gene in zahlreichen Kopien vorliegen. Man kennt in der Eukaryonten-DNS (vgl. S. 24) solche wiederholten Sequenzkopien, doch der größte Teil der DNS besteht aus einer einzigen Kopie. Man könnte folgendes einwenden: Während jede Zelle eine Kopie aller master Gene besitzt, werden die slave Gene des entsprechenden master Gens nur bei Bedarf gebildet (Genamplifikation). Für die ribosomalen Gene der Oocyten scheint dies zuzutreffen (vgl. Abschnitt 4.2). Der gleichbleibende DNS-Gehalt verschiedener Zellen spricht aber dagegen. Sowohl Thomas [4], als auch andere Autoren haben sich mit Callens Hypothese auseinandergesetzt [5].

Das Diplotänstadium der Oocyte kann Monate oder Jahre dauern. Die Chromosomen behalten dabei die Struktur von Lampenbürsten. Während dieser Zeit wird ununterbrochen RNS synthetisiert. Auf Grund von Berechnungen verursacht diese RNS die riesige mRNS-Menge im reifen Ei. Allein die Synthese einer großen Zytoplasmamenge, die zur Eibildung gebraucht wird, scheint der Grund für die Struktur der Lampenbürstenchromoso-

men zu sein. Außerdem muß das Ei mit mRNS versorgt werden, die aber noch inaktiv ist. Die mRNS wird dann für die ersten Teilungen der Embryogenese benötigt.

Es gibt noch mindestens zwei weitere Möglichkeiten wie sich die Chromosomenstruktur ändert, um das ungleiche Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma auszugleichen. Eine Möglichkeit entdeckte man ebenfalls in Oocyten (vgl. Abschnitt 4.2), die andere in den Speicheldrüsen der Fliegenlarven.

4.1.2. Polytäne Chromosomen

Normalerweise trennen sich bei der Mitose unmittelbar vor der Zellteilung die beiden Tochterchromosomen vollständig, und es entstehen zwei getrennte Kerne. Bei einer Anzahl von Fliegenlarven wird dieser Vorgang während der Differenzierung der Speicheldrüse abgebrochen. Die Mitose findet nicht statt, die Tochterchromosomen trennen sich ebenfalls nicht, sondern bleiben aneinandergelagert. Durch die Zunahme der Zytoplasmamenge bleibt das Verhältnis DNS zu Zytoplasma aufrecht erhalten. Es entstehen riesige Zellen, die im Falle der *Drosophila* 500–1000 Kopien von jeder Chromatide enthalten. Bei der Mücke *Chironomus* sind es sogar $4–8 \times 10^3$ Kopien. Die vervielfachten Chromatiden bleiben auch im Bereich der Chromomeren aneinandergelagert. Aus der exakten Aneinanderlagerung zahlreicher Chromomeren ergibt sich das charakteristische Querscheibenmuster der polytänen (vielsträngigen) Chromosomen. Sie sind ungefähr 1 mm lang und 50 μm dick. Man kann sie mit bloßem Auge erkennen. In der klassischen Genetik konnte man Beziehungen zwischen bestimmten Mutationen und Veränderungen an gewissen Querscheiben aufzeigen. Jede Querscheibe könnte einem Mendelschen Gen entsprechen. Das Querscheibenmuster der polytänen Chromosomen in der Speicheldrüse ist mit dem der polytänen Chromosomen in den Haftorganen der Gliedmaßen oder in den Malphigischen Gefäßen identisch und stimmt generell mit allen Zellen überein, die polytäne Chromosomen besitzen. Genaue Beobachtungen des Musters im selben Gewebe zu verschiedenen Entwicklungszeiten, oder in verschiedenen Geweben zur selben Zeit, ließen leichte Unregelmäßigkeiten im Muster erkennen. Sie werden durch eine allgemeine Auflockerung der Chromosomenstruktur verursacht. Die aufgelockerten Querscheiben nennt man Puffs. Untersuchungen mit radioaktiven RNS-Vorstufen haben gezeigt, daß die RNS-Synthese in den Puffre-

gionen am intensivsten verläuft. Das Puffmuster ist erwartungsgemäß in hohem Maße zeit- und gewebespezifisch, wenn wir einen Puff als morphologischen Ausdruck eines aktiven Gens betrachten.

In einem Fall konnte man ein spezifisches Polypeptid mit der Ausbildung eines bestimmten Puffs in Zusammenhang bringen. Die Larven von zwei *Chironomus*arten haben unterschiedlich zusammengesetzte Speicheldrüsensekrete. *Chironomus tentans* hat in bestimmten Zellen der Speicheldrüse keine Granula. Seiner Mucopolysaccharidsekretion fehlt ein Polypeptid, das bei *C.pallidivittatus* vorkommt. *C.pallidivittatus* hat in bestimmten Zellen der Speicheldrüse eine Reihe von Granula. Kreuzungen zwischen den beiden Arten haben bewiesen, daß die Fähigkeit, das vollständige Sekret mit diesen Granula zu bilden, nach den Mendelschen Regeln vererbt wird. Das Gen dafür liegt auf Chromosom 4, nahe dem Zentromer. An dieser Stelle liegt im Speicheldrüsenchromosom von *C.pallidivittatus* ein auffälliger Puff, der beim homologen Chromosom von *C.tentans* fehlt. Der Zusammenhang zwischen einem spezifischen Puff auf Chromosom 4, den Granula in einigen Zellen der Speicheldrüse und zwischen einem spezifischen Polypeptid der Mucopolysaccharidsekretion konnte eindeutig nachgewiesen werden [6, 7]. Mikroanalysen der RNS von isolierten Speicheldrüsenchromosomen bei *C.tentans* zeigten, daß an verschiedenen Puffs RNS-Moleküle mit verschiedener Basenzusammensetzung gebildet werden. Ein Puff stellt also ohne Zweifel ein Gen bei der Transkription dar. So wie die Schleife eines Lampenbürstenchromosoms die DNS einer Chromomere in lockerer, aktiver Form repräsentiert, so stellt ein Puff die entsprechende Form der DNS einer Querscheibe bei polytänen Chromosomen dar. (Die Querscheiben entstehen durch die unmittelbare Aneinanderlagerung homologer Chromosomen.)

Bei Insekten kontrollieren Hormone die Differenzierung (Abschnitt 3.7). Clever und andere Wissenschaftler lieferten einen eleganten Nachweis dafür, daß Puffs aktivierte Gene darstellen. Als sie Chironomuslarven das Hormon Ecdyson injezierten, löste dies eine vorzeitige Häutung aus. Außerdem trat bei den Speicheldrüsenchromosomen in festgelegter Reihenfolge ein bestimmtes Puffmuster vorzeitig auf. Damit verändert sich auch das Speicheldrüsensekret. Es wird jetzt für die Verpuppung benötigt und nicht mehr bei der Ernährung der Larve gebraucht. Die vorzeitig ausgelösten Puffs stimmen in ihrer Reihenfolge mit den

Puffs überein, die bei der normalen Verpuppung ausgelöst werden. Die spezifische Wirkung des Ecdysons erkennt man daran, daß es bei verschiedenen Arten sehr unterschiedliche, aber immer ganz bestimmte Wirkungen hervorruft. Bei *Acricotopus* bewirkt Ecdyson primär die Kondensation und das Verschwinden der Puffs. Bei *Drosophila* erscheinen durch das Hormon ungefähr 30 Puffs fast gleichzeitig und nicht mehr nacheinander. Der Wirkungsmechanismus von Ecdyson ist unbekannt. Es könnte direkt auf einen Puff einwirken oder indirekt, indem es das Ionengleichgewicht im Kern verändert. Wie dem auch sei, Ecdyson wirkt nicht nur artspezifisch, sondern auch gewebespezifisch. Dies entspricht unseren Vorstellungen von einem Agens, das eine differentielle Genaktivität auslöst. (Die von Ecdyson hervorgerufenen Puffs bei Speicheldrüsenchromosomen sind nicht die gleichen wie in den Haftorganen der Gliedmaßen.)

Mikrospektralphotometrische Analysen des DNS-Gehaltes der Querscheiben an polytänen Chromosomen zeigten, daß jede Querscheibe einen DNS-Gehalt besitzt, der mit dem ganzen Genom von *E.coli* vergleichbar ist. Wie bei den Chromomeren und Schleifen der Lampenbürstenchromosomen liegen in einer Querscheibe viele Kopien von jedem Gen. Diese Schlußfolgerung wurde durch die Untersuchung des DNS-Gehaltes der homologen Querscheiben bei zwei eng verwandten *Chironomus* Unterarten bestätigt; *C.thummi thummi* und *C.thummi piger*. Bei diesen Tieren ist das Querscheibenmuster der Chromosomen qualitativ sehr ähnlich. Bei *C.thummi thummi* sind jedoch einige Querscheiben dicker und größer als die homologen bei *C.thummi piger*. Die dickeren Querscheiben enthalten genau 2^n mal so viel DNS wie die Querscheiben der anderen Unterart. (Die Größe von n kann in den einzelnen Querscheiben verschieden sein.) Eine Querscheibe entspricht demnach nicht nur einem Mendelschen Allel, einer Struktur- und Funktionseinheit, sondern ebenso gut einer Replikationseinheit. Es muß also unabhängige Kontrollelemente geben, die den jeweiligen Grad der Genamplifikation regulieren. Diese Kontrollen müßten gewebespezifisch sein. In einem besonderen Fall – bei den ribosomalen Genen – konnte man solche gewebespezifischen Kontrollelemente nachweisen (vgl. Abschnitt 4.2). Im Allgemeinen enthalten die Puffs nicht mehr DNS als die Querscheibe, aus der sie hervorgehen. An den Puffs wird RNS, keine DNS synthetisiert. Eine Ausnahme dieser Regel bilden die *Sciariden*. Bei ihnen erfolgt an bestimmten Puffs eine spezifische

DNS-Synthese und damit eine Genamplifikation. Bisher wurde von keinen anderen DNS-Puffs berichtet. Doch müßten solche Puffs natürlich deutlich ausgeprägt sein, wenn man sie zytologisch erfassen will. Eine geringe Genamplifikation könnte man leicht übersehen.

Der Kurvenverlauf der DNS-DNS Hybridisierung mit DNS aus *Drosophila* Speicheldrüsen legt im Gegensatz zu den zytologischen Ergebnissen nahe, daß der größte Teil einer Querscheibe aus einzelnen Kopien mit einer einzigen Basensequenz besteht. Der Widerspruch macht deutlich, wie schwierig es für uns gegenwärtig ist, derartige Phänomene zu verstehen [5].

4.1.3. Heterochromatin

Chromosomen der Zellen, die sich gerade nicht teilen, befinden sich normalerweise in einem relativ aufgelockerten Zustand. Diese Auflockerung ist in den Bereichen des Chromosoms maximal, die sich nur schwach anfärben lassen (Euchromatin). Wo die Färbung am intensivsten ist, sind die Chromosomen kaum aufgelockert (Heterochromatin). In einigen Kernen haben die Chromosomen immer ein ganz bestimmtes heterochromatisches Muster. Am deutlichsten sieht man es in manchen Zellen weiblicher Säugetiere. Die weiblichen Säugetiere haben in der Regel zwei X Chromosomen, die männlichen ein X und ein Y Chromosom. Ganz selten gibt es Tiere mit nur einem X Chromosom (XO). Sie haben einen weiblichen Phäontyp, und deshalb ist nur ein aktives X Chromosom nötig, um den weiblichen Phänotyp auszuprägen. Das Y Chromosom enthält abgesehen von den geschlechtsbestimmenden Genen keine oder nur wenige Gene, das X Chromosom dagegen eine ganze Reihe. Aus Untersuchungen zur Expression dieser Gene weiß man, daß während des Differenzierungsprozesses bei den weiblichen Säugetieren eines der beiden X Chromosomen, vom Zufall abhängig, inaktiviert wird. (Bei diesen Untersuchungen erwiesen sich die Gene auf dem X Chromosom, die die Fellfärbungen bestimmen, als besonders geeignet.) Inzwischen konnte man auch einen Klon aus Hautzellen isolieren. Sie stammten von weiblichen Tieren, die für Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase heterozygot waren. (Das Gen für die Dehydrogenase liegt auf dem X Chromosom.) Bei diesem Klon findet man nur eine, aber nie beide der allelen Formen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Man kennt noch ein ähnliches Beispiel, das Gen für Hyperurämie. Obwohl das genannte Bei-

spiel keinen absoluten Beweis darstellt, ist es doch sehr wahrscheinlich, daß eines der beiden X Chromosomen völlig inaktiviert wird, und es zwei Zellpopulationen der weiblichen Säugetierhaut gibt. Bereits Barr beobachtete in vielen weiblichen, doch nie in männlichen Zellkernen, einen heterochromatischen Körper, der erst spät in die Replikationsphase eintritt. Man nennt ihn heute »Barr-Körperchen«. Das Barr-Körperchen scheint das inaktivierte X Chromosom zu sein. Es stellt somit eine weitere Möglichkeit dar, den kondensierten (supercoiled) Zustand der Chromosomen mit der biochemischen Inaktivität in Zusammenhang zu bringen. Wahrscheinlich sind das diffuse Euchromatin und das kondensierte Heterochromatin die beiden möglichen Zustandsformen, wie Chromosomen oder einzelne Bereiche davon vorkommen können. Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen Euchromatin bei normalen Chromosomen, Puffs bei polytänen Chromosomen und Schleifen bei Lampenbürstenchromosomen einerseits, und zwischen Heterochromatin, Querscheiben und Chromomeren bei den entsprechenden Chromosomen andererseits.

Man wandte auch andere Färbemethoden an, z. B. Fluoreszenzfarbstoffe, um einzelne Bereiche der Chromosomen zu unterscheiden. Die unterscheidbaren Bereiche werden höchstwahrscheinlich durch die unterschiedliche Kondensation der Chromosomenabschnitte hervorgerufen. Euchromatin und Heterochromatin kann man damit auch unterscheiden.

Kürzlich konnte man an isolierten polytänen Chromosomen, denen man radioaktive Vorstufen der RNS zugeführt hatte, markierte RNS nachweisen. Dies bedeutet, daß die Chromosomen selbst den ganzen Mechanismus der Biosynthese besitzen, der für die RNS-Synthese notwendig ist. Wie dieser Mechanismus funktioniert und wie er kontrolliert wird, kann man mit rein zytologischen Untersuchungen jedoch nicht zeigen.

4.1.4. Biochemie der Chromosomen

Leider ist die Biochemie der Chromosomenfunktion noch nicht soweit erforscht, daß man das Verhalten der Lampenbürstenchromosomen, die Kontrolle der Puffs und die Bildung von Heterochromatin auf molekularer Ebene erklären könnte. In den Chromosomen gibt es neben zwei Proteinarten (Histone und saure Proteine) RNS-Moleküle, die mit der DNS verknüpft sind.

Diese Moleküle müssen die Aktivität der DNS auf irgend eine Weise regulieren.

Histone sind basische Proteine mit relativ niedrigem Molekulargewicht. Man unterscheidet fünf verschiedene Histongruppen, die sich hauptsächlich in ihrem basischen Charakter und im Arginin- und Lysingehalt unterscheiden. Während sich Eosin vorzugsweise an die lysinreichen Histone bindet und diese anfärbt, reagiert »fast green« mit dem argininreichen Teil. Kerne aus unterschiedlichen Geweben reagieren mit diesen beiden Farbstoffen nicht gleich, sogar die Chromosomen aus einem einzigen Kern färben sich unterschiedlich an. Auch während der Zelldifferenzierung können sich die Chromosomen in bezug auf ihre Färbbarkeit verändern. Zum Beispiel lassen sich Kerne in zukünftigen roten Blutkörperchen mit Eosin immer stärker anfärben, je weiter die Differenzierung fortschreitet. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß es nur von den Histonen abhängt, ob ein Gen transkribiert wird oder nicht. Histochemische Histonfarbstoffe färben gepuffte und ungepuffte Bereiche der polytänen Chromosomen gleich stark an, obwohl man von unspezifischen Proteinfärbungen weiß, daß die Puffs einen höheren Proteingehalt haben als die ungepufften Chromosomenabschnitte. Dieses zusätzliche Protein reagiert daher eher sauer als basisch. Man kann sich nur schwer vorstellen, wie Histone die Genaktivität regulieren könnten. Im molekularen Bereich unterscheiden sich die Histone nur wenig, und bei den verschiedensten Lebewesen sind sie sich erstaunlich ähnlich. Man hat das Histon IV aus Erbsen und Kalbsthymus gereinigt und die Aminosäuresequenz der beiden Proteine bestimmt und konnte kaum einen Unterschied feststellen. Obwohl Kühe und Erbsen in der Evolution sicherlich seit langem getrennte Entwicklungen durchlaufen, gab es an diesem Protein, dem Histon IV, keine Veränderung, die die Struktur (und damit die Funktion) betraf. Nach all dem spielen die Histone eine so entscheidende Rolle, daß jede Veränderung in ihrer Struktur für den Organismus letal ist. Daß die Histone unmittelbar an der Regulation der Genaktivität beteiligt sind, ist auch deshalb unwahrscheinlich, weil sich die Regulationsmechanismen während der Evolution grundlegend veränderten.

Die chromosomale RNS besteht aus einer hochgradig dispersen Fraktion mit hohem Molekulargewicht und einer Fraktion mit sehr niedrigem Molekulargewicht. Die schwere Fraktion besteht wahrscheinlich aus Molekülen, die gerade transkribiert wurden,

als man das Chromosom isolierte. Die chromosomale RNS-Fraktion mit dem niedrigen Molekulargewicht umfaßt eine besondere Klasse von Molekülen, die durch einen hohen Dihydropyrimidingehalt gekennzeichnet ist [8]. Dihydropyrimidin ist aber auch für transfer RNS charakteristisch. Wenn man diese RNS nach verschiedenen Methoden isoliert, enthalten die Chromosomen ganz unterschiedliche Mengen der Fraktion. Es könnte sich also sehr wohl um Fragmente der transfer RNS handeln, die während der Aufarbeitung an den Chromosomen adsorbiert wurden.

Die sauren Proteine, die man in den Chromosomen findet, sind recht unterschiedlich und haben ein hohes Molekulargewicht. Es ist schwierig, diese Proteine zu untersuchen, da sie unlöslich sind und in Lösungen mit niedrigem Ionengehalt zur Aggregation neigen. Es gibt, so wurde behauptet, deutliche Unterschiede innerhalb der chromosomengebundenen sauren Proteinfraktionen, wenn diese aus verschiedenen Geweben eines Lebewesens oder aus dem gleichen Gewebe zu verschiedenen Entwicklungszeiten stammen. (Dies würde unseren Vorstellungen entsprechen, wenn die Moleküle tatsächlich an der Regulation der Genaktivität beteiligt wären.) Da die Extraktion der sauren Proteine mit starken Mitteln und unter extremen Bedingungen durchgeführt wird, könnten die Unterschiede aber auch durch Artefakte bedingt sein.

Daß die sauren Proteine dennoch viel eher als die Histone für eine spezifische Genregulation geeignet sind, ergab sich aus den Untersuchungen über die Wirkung der sauren Proteine auf die *in vitro* Transkription. Bis jetzt konnte man keine homogene Säugetiertranskriptase isolieren. Gereinigte Säugetier-DNS ist jedoch für das Bakterienenzym eine brauchbare Matritze (Tabelle 1). Unter normalen Versuchsbedingungen werden nur Sequenzen transkribiert, die mindestens in einer Konzentration von 10^3 Kopien pro Genom vorliegen. Wenn man zu den DNS-Proben Histone zugibt, geht die RNS-Syntheserate deutlich zurück. Da Komplexe aus DNS und Histonen in schwach sauren Lösungen, die für die Enzymversuche verwendet werden, unlöslich sind, besitzt der hemmende Effekt keinen großen Aussagewert für die physiologische Bedeutung der Histone bei der »Maskierung« der DNS. Es genügt nicht, wenn man nur zeigt, daß eine Substanz die Syntheserate oder die Menge der gebildeten RNS verringert. Um die differentielle Genaktivität zu erklären, die man während der Differenzierung beobachtet, braucht man eine *spezifische*

Hemmung der RNS-Synthese bei einigen Molekülen, bei anderen aber nicht.

Paul und Gilmour [9] benutzten eine DNS-RNS Hybridisierung, um die Eigenschaft der gebildeten RNS-Moleküle zu bestimmen. Sie legten verschiedene Matritzen vor und untersuchten so die Spezifität der RNS-Synthese. DNS und natives Chromatin wurden als Matritzen eingesetzt, und man benutzte die daran gebildeten RNS-Moleküle zur Hybridisierung mit gereinigter DNS. Die RNS-Probe, die von Chromatinmatritzen stammte, hybridisierte mit einer viel kleineren DNS-Fraktion als die RNS, die man von der DNS als Matritze erhalten hatte. Natives Chromatin beschränkt also die Transkription auf bestimmte Abschnitte der DNS. Man verglich RNS, die *in vitro* an Chromatin transkribiert wurde, mit impulsmarkierter RNS, die *in vivo* im entsprechenden Gewebe synthetisiert wurde. Es zeigte sich, daß beide sehr ähnlich sind, und daß die hemmende Wirkung des Chromatins auf die Transkription physiologische Bedeutung hat. Man machte auch Hybridisierungsexperimente, bei denen die *in vitro* gebildete RNS als Competitor (Konkurrenz) eingesetzt wurde. RNS-Proben aus dem Chromatin verschiedener Gewebe verhielten sich unterschiedlich (Abb. 4.2).

Als man gereinigte DNS mit Histonen und sauren Proteinen in einer Lösung mit hohem Salzgehalt mischte und anschließend

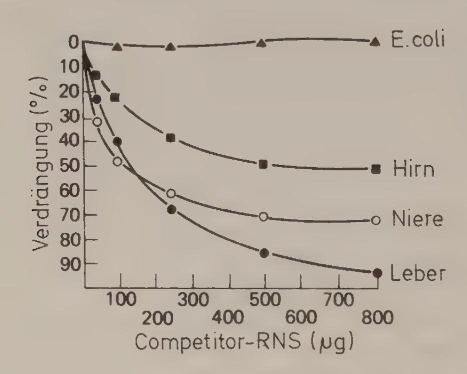


Abb. 4.2: Radioaktiv markierte RNS aus Leberchromatin wurde mit DNS hybridisiert, dabei lag »kalte« RNS aus Hirn, Niere, *E. coli* und Leber vor. Das Ausmaß, mit dem diese RNS-Proben die Bindung der radioaktiven RNS an die DNS verringerten (Verdrängung in %), wurde gemessen. Nach [9]

dialysierte, um die Salze zu entfernen, erhielt man ein Chromatin, das ähnliche Eigenschaften wie natives Chromatin besaß. Dies besagt: Chromatinkomplexe können sich spontan wieder zusammenlagern. Heute kann man experimentell Chromatin wieder schrittweise zusammenfügen, indem man eine Komponente nach der anderen zufügt. Nach jedem Schritt prüft man, welcher Teil für die spezifische Verringerung der Transkription verantwortlich ist. Leider sind die Ergebnisse dieser Experimente nicht eindeutig. Nicht ganz unerwartet treten zwischen den verschiedenen Proteinanteilen synergide Wirkungen auf, aber die sauren Proteine scheinen sehr stark zur spezifischen Regulation beizutragen. Übereinstimmend damit ist folgende Beobachtung: Durch Renaturierung kann man Chromatin gewinnen, dessen DNS, Histone und ›Nicht-Histon-Proteine‹ aus jeweils verschiedenen Geweben stammen. Die Transkriptionsprodukte des »zusammengesetzten« Chromatins sind dieselben, die man normalerweise in dem Gewebe findet, woraus die Nicht-Histon-Proteine stammen.

Über die eigentliche Frage, wie Histone und saure Proteine im molekularen Bereich wirksam werden, weiß man nur wenig. Erst in jüngster Zeit kam man diesem Problem etwas näher, als man die außergewöhnliche Spermatogenese der Forellen eingehender untersuchte [10]. Im Sperma der Forellen bildet die DNS nicht mit Histonen, sondern mit Protaminen einen Komplex. Im Verlauf der Spermatogenese müssen demnach die Histone aus dem Chromatin entfernt und durch Protamine ersetzt werden. Wenigstens in einem Fall wird ein Histonmolekül durch eine Reihe ganz bestimmter Phosphorylierungen entfernt. Die Phosphorylierungen erfolgen an Serinmolekülen, die nahe am N-terminalen Ende des Moleküls liegen. Histone werden außerdem leicht acetyliert, und es ist möglich, daß solche Strukturveränderungen zu einer gewebespezifischen, streckenweisen Maskierung führen können. (Vielleicht katalysieren die Nicht-Histon-Proteine des Chromatins diese Veränderungen). Das an der Phosphorylierung der Histone beteiligte Enzym wird, wie man inzwischen zeigen konnte, durch cAMP aktiviert [11]. cAMP spielt bei einer Reihe hormonabhängiger Vorgänge eine charakteristische Mittlerrolle. Man weiß nicht, ob cAMP an der Spermatogenese beteiligt ist, aber sicher bringen uns die Untersuchungen solcher Vorgänge weiter. Dann werden wir verstehen, wie es zu einer Lockerung und Trennung der Histone von der DNS kommt.

Die besondere Problematik, die wir durch Gameten kennen-

lernten, ist sicherlich nicht auf Zellen beschränkt, die sich gerade in einem außergewöhnlichen Zustand befinden. Wir befaßten uns mit Vorgängen, die wahrscheinlich allgemein verbreitet sind. Aus diesem Kapitel können wir folgende Punkte festhalten:

1. Die Chromosomen sind Struktur-, Replikations- und Funktionseinheiten.
2. Jede Chromomere enthält weit mehr DNS, als für die Codierung der Aminosäuresequenz eines Proteinmoleküls notwendig ist.
3. Ein Chromosomenabschnitt kann verschiedene Formen annehmen. Die Zustandsform hängt davon ab, ob der Abschnitt inaktiv ist, oder ob dort gerade Replikation oder Transkription stattfindet.
4. Die verschiedenen Zustandsformen der Chromosomen kann man durch charakteristische Veränderungen bei Färbungen erkennen.

(5) Die heterochromatischen Abschnitte der normalen Chromosomen sind inaktiv. Sie entsprechen den Chromomeren der Lampenbürstenchromosomen und den Querscheiben der polytänen Chromosomen. Die euchromatischen Bereiche der normalen Chromosomen stellen dagegen aktive Abschnitte dar. Sie entsprechen den Schleifen der Lampenbürstenchromosomen und den Puffs der polytänen Chromosomen.

Biochemische Untersuchungen haben noch weitere Punkte ergeben:

6. Die differentielle Genaktivität in verschiedenen Geweben kann man an der unterschiedlichen Synthese der RNS-Moleküle erkennen, die aus verschiedenen Geweben stammen.
7. Hauptsächlich die sauren Proteine sind für die spezifische Maskierung von verschiedenen DNS-Abschnitten auf den Chromosomen verantwortlich. Die Abnahme der Transkription an ganz bestimmten DNS-Abschnitten scheint eine Folge der Wechselwirkung zwischen Histonen und sauren Proteinen zu sein.
8. Die Histone sind sehr einheitliche Moleküle. Da aber jedes Molekül reversibel phosphoryliert und/oder acetyliert werden kann, ist seine Struktur genügend wandelbar.
9. Die Wirkung von Ecdyson auf das Puffmuster der polytänen Chromosomen und von cAMP auf die Phosphorylierung der Histone gaben die ersten Hinweise, wie die Chromosomen auf Veränderungen des Stoffwechsels und des Milieus reagieren.

Das Chromosom betrachtet man am besten als Organelle, deren Funktion die kontrollierte und spezifische Produktion der RNS-Moleküle ist. Diese Organelle ist wie keine andere unmittelbar an der Zelldifferenzierung beteiligt. Wenn wir die Struktur und Wirkungsweise der Chromosomen verstehen, kommen wir dem Phänomen der Zelldifferenzierung einen Riesenschritt näher.

4.2. RNS-Synthese

Untersuchungen über die Eigenschaft solcher RNS-Moleküle, die an Chromatinmatritzen mit bakterieller Polymerase synthetisiert wurden, hat man kritisiert. Es ist nämlich nicht sicher, ob diese RNS-Moleküle eine Basensequenz besitzen, die danach auch translatiert werden kann. Wenn man unter normalen Bedingungen die Transkription an Chromatinpräparaten mißt, können selbstverständlich nur Basensequenzen mit relativ hoher Konzentration eine faßbare RNS-Menge liefern. Man muß zuerst die Beziehung zwischen wiederholten DNS-Sequenzen und einem Strukturgen klären, ehe man die Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.4 nach ihrer wahren Bedeutung einordnen kann.

Wenn man eine Eukaryontenzelle kurzfristig mit radioaktiven RNS-Vorstufen füttert, werden diese rasch in ganz unterschiedliche RNS-Moleküle mit hohem Molekulargewicht eingebaut. Diese RNS-Moleküle kommen im Kern vor (HnRNS) und haben eine sehr kurze Halbwertszeit. Von der Radioaktivität, die die Moleküle bei diesen Versuchen aufnehmen, findet man nur wenig im Zytoplasma, und zwar so lange, bis die HnRNS-Moleküle mehrfach auf- und abgebaut wurden. Ob diese Moleküle etwas mit der mRNS zu tun haben, weiß man nicht. Bei den Eukaryonten muß die mRNS nämlich vor der Translation ins Zytoplasma transportiert werden. HnRNS könnte sehr wohl eine Kontrollfunktion inne haben, doch mit der mRNS als solcher in keinerlei Beziehung stehen [12]. Wenn man das Zytoplasma nach einem Impulsexperiment (pulse-chase-experiment) auf markierte RNS hin untersucht, findet man die Isotope größtenteils in der ribosomalen RNS (rRNS) und nicht in der mRNS. Deshalb beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Synthese spezifischer RNS-Moleküle. Sie wollen die Faktoren bestimmen, die während der Zelldifferenzierung die differentielle RNS-Synthese kontrollieren.

Da die RNS der Ribosomen offensichtlich spezifisch ist, die Moleküle ausreichend stabil sind und in den meisten Zellen in großen Mengen vorkommen, befaßte man sich als erstes mit ihnen.

4.2.1. Synthese der ribosomalen RNS

Färbt man Zellen mit RNS-spezifischen Reagentien an, dann färbt sich ein bestimmter Bereich im Kern besonders stark – der Nukleolus. Den Nukleolus kann man mit dem Phasenkontrastmikroskop oft schon in lebenden Zellen sehen, und er ist wahrscheinlich in Eukaryontenzellen allgemein verbreitet. Innerhalb der Nukleolussubstanz befindet sich ein besonderer Chromatinanteil. Während der Zellteilung verdichtet sich dieses Chroatin auf einem oder mehreren Chromosomen zum sogenannten »Nukleolusorganisator«. Der Nukleolus selbst dagegen verschwindet. Die Kerne haben mindestens genau so viel oder noch mehr Nukleoli als Nukleolusorganisatoren. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, daß der Nukleolusorganisator der Abschnitt auf dem Chromosom ist, der die ribosomalen Gene trägt. Auch hängt die

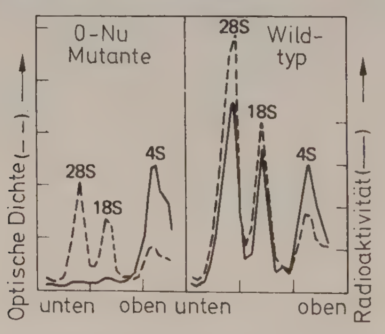


Abb. 4.3: Saccharosedichtegradient der RNS aus *Xenopus*-Embryonen (Mutante O-Nu und Wildtyp). (Nach Brown 1966)

Synthese der Ribosomen mit dem Nukleolus zusammen. Die stichhaltigsten Beweise lieferten wie schon oft Untersuchungen mit nahe verwandten Mutanten, in diesem Fall mit Mutanten von *Xenopus laevis*.

1958 entdeckte man eine Mutante, die an Stelle von normalerweise zwei Nukleoli nur einen besaß. Diese Linie nannte man 1-Nu. Phänotypisch sind die Tiere normal und wachsen zu fort-

pflanzungsfähigen Organismen heran. Aus der Kreuzung 1-Nu × 1-Nu gehen drei verschiedene Typen hervor: Homozygoter Wildtyp (2-Nu), heterozygote Mutanten (1-Nu) und homozygote Mutanten (0-Nu) im Verhältnis 1:2:1. Die 0-Nu Mutanten sterben während oder unmittelbar nach dem frühen Larvenstadium. Man führte ein Markierungsexperiment durch, bei dem man die späte Gastrula der 1-Nu × 1-Nu Kreuzungen 20 Stunden lang mit $^{14}CO_2$ behandelte und danach für weitere 2 Tage in normales Medium mit $^{12}CO_2$ übertrug. Als man anschließend den Nucleinsäuregehalt der beiden Linien im Saccharose Dichtegradienten analysierte, fand man, daß die 0-Nu Embryonen keine radioaktive rRNS besaßen (siehe Abb. 4.3). Nach diesem Experiment ist die genetische Information, die für die Synthese der rRNS notwendig ist, in den 0-Nu Embryonen entweder nicht vorhanden, oder sie kommt nicht zum Ausdruck. Hybridisierung der rRNS aus dem Wildtyp mit der DNS aus 2-Nu, 1-Nu und 0-Nu Embryonen zeigte, daß die Gene für rRNS bei den 0-Nu Tieren tatsächlich nicht vorhanden sind, und daß diese Gene im Nukleolusorganisator liegen (Abb. 4.4). Betrachtet man die DNS-Menge bei der DNS-RNS Hybridisierung vom Wildtyp im Sättigungsbereich (Abb. 4.4), sieht man, daß ungefähr 0,07 % der diploiden DNS-Menge in der Basenzusammensetzung komplementär zur rRNS sind. Ein diploider Kern enthält ca. 6 pg DNS ($= 6 \times 10^{-12}$ g). Dies entspricht $3,6 \times 10^{12}$ Daltons (1 Wasserstoffatom wiegt 1 Dalton). 0,07 % davon sind $2,5 \times 10^{9}$ Daltons. Das Molekulargewicht der 28 SrRNS beträgt ungefähr $1,6 \times 10^{6}$ Dal-

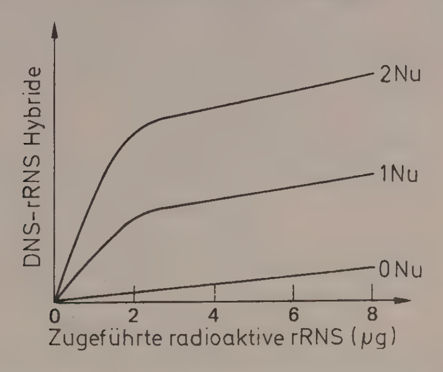


Abb. 4.4: Hybridisierung von zunehmenden rRNS-Mengen von *Xenopus* mit einer konstanten DNS-Menge aus den Embryonen des Wildstammes und der Mutanten

tons, und deshalb ergeben sich für einen diploiden Kern von *Xenopus* annähernd $2{,}5/1{,}6 \times 10^3$ oder 1600 Kopien der rRNS-Gene.

Man führte entsprechende Versuche wie bei *Xenopus* mit den »bobbed« Mutanten von *Drosophila* durch. Die Ergebnisse waren im Wesentlichen dieselben.

Obwohl bei den Embryonen der 0-Nu Mutanten keine radioaktive rRNS nachgewiesen wurde (Abb. 4.3), besitzen sie trotzdem rRNS, und obwohl die Zellen dieser Mutante selbst keine rRNS synthetisieren können, enthalten sie Ribosomen. Die Ribosomen können nur aus dem Ei stammen. Die *Xenopus* Eier haben nachweislich sehr viele Ribosomen. Nach all dem ist die Oocyte das geeignete Objekt, um die rRNS-Synthese zu untersuchen.

Die Synthese der rRNS ist bei der heranreifenden Oocyte im Pachytän und Diplotän der Meiose maximal. Während des Pachytäns (es dauert bei der Oocyte einige Wochen) erscheint über dem Kern eine »Kernkappe«. Stark radioaktive rRNS aus kultivierten *Xenopus* Zellen kann man als zytologischen Nachweis verwenden, um die DNS-Sequenzen, die der rRNS komplementär sind, zu lokalisieren (vgl. S. 24). Mit dieser Technik konnte man nachweisen, daß die Kernkappe zahlreiche Kopien solcher ribosomaler DNS-Sequenzen enthält [12]. Auf das Pachytän folgt das Diplotän. (Die Chromosomen nehmen die Form von Lampenbürstenchromosomen an.) Zu diesem Zeitpunkt verschwindet die Kernkappe, und man erkennt rund 1000 Nulkleoli, die auf der inneren Kernmembran gruppenweise zusammenliegen. Die Oocyte verbleibt monatelang im verlängerten Diplotän. In diesem Stadium nimmt die Zytoplasmamenge stark zu, und eine riesige Menge ribosomaler Bestandteile, die für das reife Ei charakteristisch sind, wird synthetisiert.

Ein Kern im Pachytän enthält rund 12 pg chromosomale DNS (das Vierfache des haploiden Gehaltes, vgl. Tabelle 2). Die Kernkappe, die gebildet wird, enthält dagegen 30 pg ribosomaler DNS. Dies bedeutet einen außergewöhnlich hohen Grad spezifischer Genamplifikation. Hybridisierungsexperimente mit rRNS und DNS der Oocyten wiesen auf mindestens 10^6 Kopien der rRNS Gene in solchen Oocyten hin. Die Oocyten-DNS müßte also ungewöhnlich viel rDNS enthalten, und nach Analysen im Dichtegradienten trifft dies auch tatsächlich zu. Die DNS aus Oocyten weist einen Kernsatelliten mit einem höheren G+C Gehalt als die Hauptbande auf (Abb. 4.5). Der Satellit enthält Se-

quenzen, die der rRNS komplementär sind [13]. Der G+C Gehalt des Satelliten unterscheidet sich jedoch etwas vom G+C Gehalt der rRNS. Außer der DNS, die der rRNS komplementär ist, muß es noch einige andere Sequenzen auf der DNS geben. Diese Bereiche nennt man »Spacer-DNS«. Sie trennt ein gekoppeltes Genpaar (Gen für 18 S RNS und Gen für 28 S RNS) von

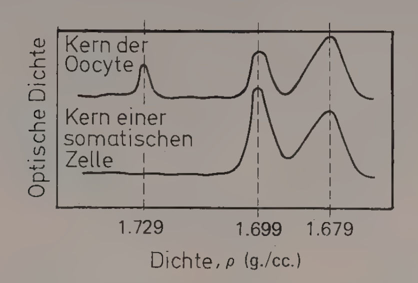


Abb. 4.5: Dichtegradient der Kern-DNS von *Xenopus leavis.* Die Kerne wurden Oocyte und den somatischen Zellen entnommen
rDNS: p = 1,729, Hauptbande: p = 1,699, Kontroll-DNS: p = 1,679. Nach [13]

einem anderen Tandempaar. Miller und Beatty haben die Nukleoli für ein elektronenmikroskopisches Präparat vorsichtig gespreitet und konnten so die Transkription im Bild festhalten (Abb. 4.6) [14]. Die Spacer-DNS kann man deutlich als einen Bereich ohne Transkription erkennen. Sie liegt zwischen zwei Strukturen, die einer Pfeilspitze gleichen. Es liegen rund 100 Polymerasemoleküle auf der DNS, an denen gerade RNS transkribiert wird. Die genaue Funktion der Spacer-DNS ist noch unbekannt. Bei *Xenopus* kennt man zwei nahe verwandte Arten, *X.mulleri* und *X.laevis*, deren Basensequenz für die rRNS-Moleküle identisch ist. Im Bereich der Spacer-DNS ist ihre Basenzusammensetzung dagegen völlig verschieden.

Nach Abb. 4.6 sind alle transkribierten Gene gleich lang, obwohl die Ribosomen bei Xenopus dreierlei RNS enthalten (5 S-, 18 S- und 28 S RNS). Die Gene für 5 S RNS liegen nicht im Bereich des Nukleolusorganisators. Es überrascht deshalb nicht, daß es keine kleinen »Pfeilspitzen« gibt. Die einheitliche Größe der Transkriptionsgebilde hat noch einen zweiten Grund. Die 18 S und 28 S RNS-Moleküle sind nämlich Endprodukte einer Reaktionskette. In Abb. 4.6 sieht man die Synthese von 35 S

Molekülen, aus denen nach der Transkription die 18 S- und 28 S RNS gebildet wird.

Man untersuchte den Syntheseweg bei Zellen in Gewebekultur und verwandte dazu Isotope in Markierungsexperimenten. Zuerst vermutete man, daß die rRNS-Moleküle auf komplexe und artspezifische Weise synthetisiert werden. Die RNS-Moleküle unterscheiden sich in ihrer Basensequenz, Sekundärstruktur und in ihrer Größe. Die beiden letzten Eigenschaften konnte man bei der

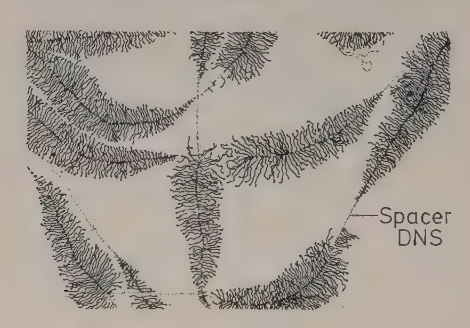


Abb. 4.6: Transkription der ribosomalen Gene des Molches. Nach einer elektronenmikroskopischen Aufnahme. Vergrößerung ca. 20 000fach [14]

Elektrophorese mit deren großer Trennungsschärfe ausnutzen. Durch die Anwendung dieser Methode ergab sich für *Xenopus* ein Verlauf der RNS-Synthese, wie er in Abb. 4.7 dargestellt ist [15]. Die Synthese unterscheidet sich bei anderen Arten anscheinend nur im Detail, obgleich die endgültige Größe der rRNS-Moleküle bei allen Eukaryonten ähnlich ist.

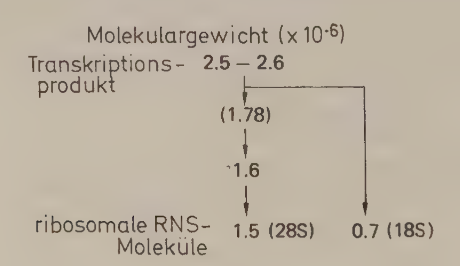


Abb. 4.7: Syntheseschema der rRNS-Moleküle bei *Xenopus*. Das Molekulargewicht der Moleküle ist in Millionen angegeben. Nach [15]

Man kennt noch keinen Grund für diese Veränderungen nach der Transkription. Sie sind offensichtlich sehr bedeutsam, da bei *Xenopus* ungefähr 15 % der anfänglichen Transkriptionsprodukte abgebaut werden. (Bei Säugetieren sind es oft 50 %.) Dies bedeutet eine beträchtliche »Verschwendung« der Stoffwechselenergien.

Die selektive Genamplifikation der ribosomalen DNS in den Oocyten läßt sich nicht ohne weiteres erklären. Man hat dafür zwei mögliche Erklärungen. 1. Die RNS-Polymerase kann nur eine ganz bestimmte Menge RNS synthetisieren. Enthielte ein Kern im Diplotän nur vier mal so viele Kopien der ribosomalen Gene wie ein haploider Kern, könnten unmöglich so viele Ribosomen synthetisiert werden, um die Oocyte in der verfügbaren Zeit ganz heranreifen zu lassen. Diese Erklärung wäre eine Möglichkeit, und die ausführlichen Berechnungen dazu klingen recht überzeugend. Es wird leider nicht erklärt, warum keine spezifische Amplifikation der Gene für die 5 S RNS-Moleküle der Ribosomen stattfindet. Wenn sie entsprechend häufig in der Oocyte vorliegen, müßten sie nach obigem Argument in somatischen Zellen sehr oft zu finden sein. 2. Die DNS des Nukleolus besitzt keine einschränkenden Kontrollmechanismen, die eine ausreichende Aktivität verhindern, wenn das Gen im Chromosom integriert ist. Die spezifische Amplifikation dieser DNS in den Oocyten steigert somit nicht nur die Matritzenzahl, sondern verändert auch die Kontrollmechanismen. Die Syntheserate der 18 S und 28 S RNS-Moleküle scheint die Synthese der 5 S RNS zu kontrollieren, weil die 0-Nu Embryonen beim *Xenopus* keine 5 S Moleküle machen, obwohl sie das dafür notwendige Gen besitzen. (Das 5 S RNS-Molekül entsteht auch erst durch Veränderungen nach der Transkription aus einer größeren Vorstufe.) Wenn die ribosomalen Proteine bei ihrer Synthese in ähnlicher Weise kontrolliert werden, dann könnte man die fehlende spezifische Amplifikation dieser Gene in der Oocyte damit erklären.

Man weiß erst wenig darüber, wie der Amplifikationsgrad der ribosomalen DNS während der Oogenese kontrolliert wird. Nach Schätzungen besitzen die Oocyten verschiedener Amphibien annähernd dieselbe Menge besonderer rDNS und daher ungefähr gleich viele Nukleoli, obwohl sie einen ganz unterschiedlichen DNS-Gehalt haben (vgl. Tabelle 2). Es liegt nahe, daß die Kontrolle der Amplifikation nach einem feed-back Mechanismus abläuft. Damit lassen sich auch die Beobachtungen an den 2-Nu

und 1-Nu Oocyten von *Xenopus* in Einklang bringen. Sie weisen gleich viel rDNS auf, obwohl die 1-Nu Zelle die Hälfte ihrer Nukleolusorganisatoren verloren hat.

Die Amphibieneier kann man als Zellen betrachten, die für die Anreicherung und Bereitstellung von Ribosomen (und anderen Substanzen) spezialisiert sind. Die spezifische Amplifikation der ribosomalen Gene kann man als Ausdruck der differenzierten Funktion betrachten. Als nächstes erhebt sich die Frage, ob dies für alle Zellen während der Differenzierung zutrifft. Erythrocyten z. B. sind darauf spezialisiert, das Protein Hämoglobin zu synthetisieren und es anzureichern. Stellen die Zellen nun während der Entwicklung zu Erythrocyten ebenfalls zahlreiche Kopien der Gene für Hämoglobin bereit?

4.2.2. Synthese der messenger RNS

mRNS, die zuerst aus Prokaryonten isoliert wurde, ist ein labiles Molekül mit hohem Molekulargewicht. Anfangs experimentierte man sehr viel mit Impulsmarkierungen, um die Synthese der mRNS und ihre Eigenschaften zu klären. Entsprechende Experimente bei Eukaryonten führten zur Charakterisierung der HnRNS (vgl. S. 61), die häufig für mRNS gehalten wurde. Da aber immer nur wenig HnRNS im Zytoplasma, wo die Translation der mRNS stattfindet, erscheint, kann diese Annahme nicht zutreffen, und sie führte zu vielen Mißverständnissen.

Definitionsgemäß ist mRNS ein RNS-Molekül, das den transkribierten Code für die Primärstruktur eines Proteins ins Zytoplasma transportiert. Solche Moleküle muß man daher als Bestandteile der Polysomen im Zytoplasma finden. Sie müssen auch die Moleküle sein, welche die einzelnen Ribosomen innerhalb der Polysomen zusammenhalten. Man versuchte die mRNS-Moleküle während ihrer Synthese im Kern mit radioaktiven Vorstufen zu markieren. Die Ergebnisse dieser Experimente waren recht verwirrend. Daher versuchte man, die mRNS am Ort der Translation – an den Polysomen – zu fassen. Die meisten Zellen synthetisieren zahlreiche Proteine und haben somit auch eine ganze Reihe verschiedener Polysomen im Zytoplasma. Will man einigermaßen homogene Polysomen erhalten, um daraus mRNS zu isolieren, braucht man unbedingt eine Zellpopulation, die vorwiegend eine Proteinart synthetisiert. Bisher wurden drei solcher Zellarten eingehend untersucht: Heranreifende Erythrocyten (Reticulocyten) der Kaninchen und Vögel, die überwiegend Hä-

moglobin synthetisieren [16], – embryonale Muskelzellen der Küken, die Tropomyosin, Myosin und Actin synthetisieren [17], – und die frühen Teilungsstadien des Seeigels, in denen besonders Histone synthetisiert werden [18]. Bei allen drei Beispielen wurden oder werden fast gleichartige Versuche durchgeführt.

Die Zellen werden vorsichtig lysiert, daß die empfindlichen Strukturen der Polysomen erhalten bleiben. Das Lysat zentrifugiert man in einem Saccharose-Dichtegradienten, um die Polysomen zu sammeln und anzureichern. Bei den Reticulocyten mit Hämoglobin als überwiegendem Protein gibt es nur einen Polysomenpeak. Bei den embryonalen Muskelzellen sind die Proteine in ihrer Größe so unterschiedlich, daß man drei getrennte Peaks für die Polysomen erhält. In jedem Peak ist besonders viel der entsprechenden mRNS vorhanden (Abb. 4.8). Beim Seeigel ist die geringe Größe der Histone (und daher auch die ihrer mRNS-Moleküle) dafür verantwortlich, daß sich die mRNS für Histone nur in einem kleinen Bereich des Gradienten befindet. Die meisten anderen Polysomen liegen in einem anderen Dichtebereich. Im günstigsten Fall bestehen etwa 0,5 % der Polysomenpräparate aus mRNS, alles andere sind verschiedene Proteine, Peptide und rRNS. Man muß also zuerst die Nukleinsäuren von den Proteinen und danach die mRNS von der rRNS trennen. Theoretisch klingt dies recht einfach, da die mRNS für Hämoglobin und Histon im Bereich von 10 S liegt. Doch in der Praxis erhält man immer eine Reihe ganz unterschiedlicher Moleküle, da man den Abbau der mRNS durch Nukleasen kaum vermeiden kann. Bei sehr guten Aufarbeitungen erhält man aus der mRNS für Hämoglobin zwei Molekülarten, die beide im Bereich von 10 S liegen und ungefähr 100 Nukleotide besitzen. Da das Hämoglobinmolekül aus zwei verschiedenen Polypeptiden, den α und β-Ketten besteht, entsprechen die zwei Molekülarten ganz unseren Erwartungen. 100 Moleküle sind aber mehr als für den Code der Primärsequenz der α und β-Ketten erforderlich sind. Die isolierte mRNS synthetisiert Hämoglobin sogar in heterologen Systemen. Dabei stammen die Ribosomen und Enzyme aus anderen Zellen als die vorgelegte mRNS. Deshalb handelt es sich hier mit großer Sicherheit wirklich um mRNS-Moleküle. Auf ähnliche Weise synthetisieren auch mRNS-Moleküle aus embryonalen Muskeln und aus den Teilungsstadien des Seeigels *in vitro* Muskelproteine und Histone. Hybridisierungsexperimente mit mRNS für Histone [19] und mRNS für Hämoglobin [20] wiesen

auf verschieden häufige Genwiederholungen hin. Es wurden auch DNS – RNS Hybridisierungen mit DNS im Überschuß durchgeführt. Danach liegen in jeder Zelle des Seeigels die Gene für Histon rund 400fach vor. Die Reticulocyte dagegen besitzt auf keinen Fall mehr als 10, eher weniger als 5 Kopien. Wahrscheinlich gibt es für Hämoglobin nur ein einziges Gen. Die Genamplifikation, wie wir sie von den Oocyten für rDNS kennen, ist nach diesen Ergebnissen also nicht allgemein verbreitet.

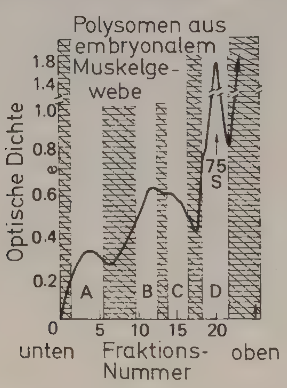


Abb. 4.8: Saccharosegradient mit Polysomen aus 14 Tage alten Hühnerembryonen. Die Polysomen stammen aus dem Gewebe der späteren Gliedmaßen. Nach [17]

In den Oocyten werden die ribosomalen Gene sicherlich einige tausend Mal vervielfacht, da innerhalb kurzer Zeit eine Menge rRNS angeliefert werden muß. Doch bei den genannten Proteinen läßt sich nicht in gleicher Weise argumentieren, da die Synthese von mehr als einem mRNS-Molekül am entsprechenden Strukturgen einer Genamplifikation gleichbedeutend ist (Abb. 4.9). Dies soll natürlich nicht heißen, daß bei den Strukturgenen für Proteine keine Genamplifikation vorkommt. Beim Seeigel ist sie bei den Histon-Genen ganz sicher vorhanden, aber wahrscheinlich geschieht die Kontrolle der rRNS-Synthese auf andere Weise als bei der mRNS-Synthese.

Man versuchte eine DNS-abhängige-RNS-Polymerase aus Eukaryonten zu isolieren. Dabei fand man mehrere solcher Enzyme, die sich in ihren Cofaktoren unterscheiden und gegenüber Inhibotoren unterschiedlich sensitiv sind. Während den frühen

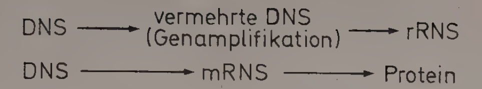


Abb. 4.9: Die Genamplifikation der ribosomalen Gene entspricht der Transkription bei den Genen, die Proteine codieren.

embryonalen Teilungen ändert sich beim Seeigel der relative Anteil der einzelnen Enzyme, so wie sich das RNS-Synthesemuster verändert. Zuerst wird bei den frühen Teilungen mRNS, danach in der späten Gastrula mRNS und rRNS synthetisiert. Verschiedene Enzyme könnten an der Synthese der unterschiedlichen RNS beteiligt sein.

Das ursprüngliche Transkriptionsprodukt der rDNS ist beträchtlich größer als das endgültige rRNS-Molekül. mRNS-Moleküle für Hämoglobin enthalten Abschnitte, an denen keine Transkription erfolgt. Daher können die ursprünglichen Transkriptionsprodukte der Strukturgene größer sein, als sie für die Codierung der Primärstruktur eines Proteins sein müssen. Es gibt Anzeichen dafür, daß einige Basensequenzen der HnRNS-Moleküle mit den Sequenzen einiger mRNS-Moleküle übereinstimmen. Die mRNS-Moleküle sind wahrscheinlich Endprodukte eines Stoffwechselgeschehens, das nach der Transkription abläuft. Vom ursprünglichen Transkriptionsprodukt gelangt in der Folge nur eine Fraktion ins Zytoplasma. Man weiß über diesen Vorgang so gut wie nichts. Doch würde man dabei bestimmt weitere Kontrollmechanismen kennenlernen, die für die Zelldifferenzierung entscheidend sind. Wenn bei den Schleimpilzen die Transkription in Gegenwart von Inhibitoren der Proteinsynthese erfolgt, sind die synthetisierten RNS-Moleküle nicht stabil; folglich sind Proteine an diesem Vorgang beteiligt. Zellfusionsexperimente wie z. B. zwischen Erythrocyten und HeLa-Zellen haben ergeben, daß der Nukleolus sowohl am mRNS-Transport als auch an der rRNS-Synthese beteiligt ist [21]. Dies ist eigentlich verständlich, da im Zytoplasma eher Polysomen als mRNS benötigt werden. Synthese und Transport der Ribosomen ins Zytoplasma sind eng verknüpft mit der Synthese und dem Transport der mRNS. Bei den embryonalen Teilungen der Seeigel und einiger Fische ist der Sachverhalt noch offensichtlicher; mRNS und Proteine lagern sich in bestimmter Weise zusammen und bilden 20–65 S Parti-

kel, die man »Informosomen« nennt. Die Partikel treten im Zytoplasma auf und werden dort zu Polysomen umgewandelt. Die Umwandlung kann lange verzögert werden, und sie unterliegt anscheinend uns bislang unbekannten Kontrollmechanismen. Eizellen scheinen einen riesigen Vorrat an Informosomen und inaktiven Polysomen zu besitzen, die nach der Befruchtung aktiviert und proteolytisch angegriffen werden [22]. Nacheinander ablaufende Vorgänge verändern das ursprüngliche Transkriptionsprodukt schrittweise und bauen es in Partikel für den Transport ins Zytoplasma ein. Schließlich erscheint das ursprüngliche Molekül in einem Polysom. In Kürze wird man die Zusammenhänge besser verstehen, da man inzwischen mit gereinigtem mRNS-Molekülen erfolgreich experimentieren kann. Es scheint, daß Komplexe aus mRNS und ribosomalen Untereinheiten gebildet werden, die denen bei Prokaryonten entsprechen [23], und daß der Weg von Adeninresten für mRNS charakteristisch ist [24]. Die allgemeine Gültigkeit dieser Ergebnisse muß aber erst noch bewiesen werden.

4.3. Proteinsynthese

Die während der Zelldifferenzierung synthetisierten Proteine sind entweder Enzyme oder Strukturproteine. Der Bedarf an Enzymen nimmt in der Regel während der Entwicklung immer mehr zu, und nur selten werden die Enzyme nicht unmittelbar benötigt. Strukturproteine werden für die Ausbildung neuer Zellstrukturen gebraucht, oder sie werden in andere Zellen transportiert. Über die Biosynthese der beiden Proteine – Enzyme und Strukturproteine – wissen wir in keinem Fall genau Bescheid. Unsere bisherigen Kenntnisse stammen hauptsächlich von den Strukturproteinen und weniger von den Enzymen.

Für Sekretzellen ist ein ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum charakteristisch. Die Polysomen (sie machen das ER zu einem »rauhen« ER) sind durch ihre großen 60 S Untereinheiten an die Membranoberfläche gebunden. Sobald das Protein synthetisiert ist, wird es ins Lumen des Retikulums abgegeben. Erwiesenermaßen liegt in der Membran ein Enzym vor, das die Bildung oder erneute Ausbildung offener Disulfidbrücken katalysiert. Die endgültige Molekülstruktur wird wahrscheinlich erst im Lumen festgelegt. Das rauhe Endoplasmatische Retikulum ist ebenso Teil des tubulären und scheibenförmigen Systems wie das

glatte ER und der Golgi Apparat. Der Golgi Apparat hat die Aufgabe, die Sekretprodukte zu »verpacken«. Dann werden sie in die Vesikel abgegeben, zur Zellmembran transportiert und gelangen so nach außen. Über das eigentliche »Verpacken« weiß man nur wenig. Da sehr viele Sekrete Glykoproteine sind, scheint der Golgi Apparat unter anderem den Anteil der Kohlenhydrate bei den Glykoproteinen zu erhöhen oder zu verändern. Eine Reihe von Proteinen, wie z. B. Insulin, werden zunächst als *eine* Polypeptidkette angeliefert. Danach wird dieses Polypeptid in zwei Ketten gespalten und wird dadurch erst zum physiologisch aktiven Molekül. Die Veränderungen der Proteine, die nach der Translation stattfinden, sind den Veränderungen der RNS nach der Transkription analog. Der mögliche Umbau der Proteine findet im oder am Golgi Apparat statt. Schließlich gelangen die Proteine in Vesikeln zur Zellmembran. Dort verschmelzen sie mit der Membran, und der Inhalt wird nach außen entleert. In einigen Geweben erfolgt die Sekretion nur in einer Richtung. In diesen Fällen scheint ein System von Mikrofilamenten oder Mikrotubuli die Vesikel so zu lenken, daß sie ihren Inhalt an der richtigen Stelle freisetzen. Die Proteinsynthese muß deshalb in solchen Zellen mit der Synthese oder Entwicklung des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi Apparates und mit einem System aus Mikrofilamenten und Mikrotubuli eng verknüpft sein. Während der Metamorphose der Kaulquappe steht die Proteinsynthese in engem Zusammenhang mit der Phospholipidsynthese. Man hat aber erst begonnen, auf biochemischer Ebene die Zusammenhänge zu untersuchen.

Nicht alle Zellen werden bei der Differenzierung zu Sekretzellen. Aber auch die anderen synthetisieren Proteine, die erst in ganz bestimmte Strukturen eingebaut werden müssen, bevor sie physiologisch aktiv sind. In der Leber von Kaulquappen treten z. B. neue Mitochondrien auf. Sie enthalten einige Enzyme des Harnstoffzyklus, die erst der Frosch nach der Metamorphose braucht. Die neuen Mitochondrien liegen zunächst rund um den Kern, wo auch eine ausgedehnte Proliferation des Endoplasmatischen Retikulums stattfindet. Wie diese Enzyme vom Retikulum zu den Mitochondrien gelangen, ist noch fraglich.

Eine Reticulocyte ist das klassische Beispiel für eine Zelle, die ein Protein, in diesem Fall Hämoglobin, synthetisiert, das weder als Sekret abgegeben wird, noch Bestandteil irgend einer anderen Struktur ist, sondern nur im Zytoplasma auftritt. Die Hämoglo-

bin synthetisierenden Polysomen liegen frei im Zytoplasma der Reticulocyte und sind an keine Membranen gebunden. Zwischen der Polysomenfunktion und der Adsorption an eine Membranoberfläche besteht demnach kein unbedingt notwendiger Zusammenhang. Eher gibt es während der Differenzierung Kontrollmechanismen, die entscheiden, ob oder auf welche Weise Polysomen mit Membranen zusammenwirken. Hämoglobin selbst ist ein kompliziert aufgebautes Protein. Das ganze Molekül besteht aus vier Polypeptidketten (je zwei gehören einem Typ an), vier Häm-Gruppen und vier Fe-Atomen. Wird ein solches Molekül zusammengebaut, dann sind sicherlich einige Kontrollen bei der Polysomenfunktion notwendig. Diese Annahme wurde durch Veröffentlichungen bestätigt, die besagen, daß es beim Zusammenbau einiger Proteine genetisch kontrollierte Störungen gibt [2]. Die Aufnahme des Eisens und der Fe-Stoffwechsel werden durch zahlreiche Hormone kontrolliert. Die Häm-Synthese scheint durch eine feed-back Inhibition kontrolliert zu werden. Dabei wirkt Hämin (Häm + Eisen) auf das erste und einzige Enzym der Porphyrin Biosynthese, auf die δ-Amino-Laevulin-Synthetase. Hämin fördert auch die Globinsynthese, indem es die Translation der mRNS für α- und β-Polypeptide auslöst. Fertige α-Ketten lagern sich an die β-Ketten an, während letztere noch mit den Polysomen verbunden sind. Diese Wechselwirkung scheint von regulatorischer Bedeutung zu sein, da α-Ketten, die nicht an β-Ketten angelagert sind, rasch abgebaut werden. Wenn die $\alpha\beta$-Untereinheiten vom Polysom freikommen, verbinden sie sich mit Hämin. Kommen danach noch weitere $\alpha\beta$-Untereinheiten und Hämgruppen dazu, entsteht ein Hämoglobin-Molekül [25]. Bei der Hämoglobinsynthese sind also zahlreiche Kontrollen auf verschiedenen Ebenen beteiligt, doch weiß man nicht, wie sie zeitlich und räumlich zusammenwirken. Zeitliche Kontrollen bestimmen, wann die Synthese beim Übergang vom Fötus zum erwachsenen Tier beginnt. Räumliche Kontrollen sorgen dafür, daß nur die entsprechenden Zellen Hämoglobin synthetisieren.

Eine echte *de novo* Proteinsynthese, wie beim Hämoglobin ist während der Zelldifferenzierung an sich selten, viel häufiger verändert sich die Enzymkonzentration. Über die geringfügigen Veränderungen ist wenig bekannt. Sie werden wahrscheinlich nicht nur durch die veränderte Syntheserate der Enzyme hervorgerufen, sondern auch dadurch, daß der Proteinabbau beeinflußt wird.

4.4. Proteinabbau

Von den Untersuchungen an Modellsystemen wissen wir bereits, daß es für die Zelldifferenzierung von gleicher Bedeutung ist, ob eine Enzymsynthese aufhört, oder ob sie neu beginnt. Doch ungeachtet dieser Bedeutung liegen über den Mechanismus, der den selektiven Proteinverlust biochemisch steuert, nur wenige Ergebnisse vor. Überraschenderweise stammen fast alle Kenntnisse über selektiven Proteinabbau aus Untersuchungen der Enzyminduktion in der Säugetierleber. Die Modellsysteme, die für solche Analysen eigentlich besonders geeignet sein müßten, trugen kaum zum besseren Verständnis dieser Vorgänge bei. Die Leber der Säugetiere ist den Veränderungen der Umgebung besonders ausgesetzt, denn sie erhält das Blut direkt aus der Leberpfortader, die vom Darm kommt. Die chemischen Einflüsse auf die Leber ändern sich in ihrer Zusammensetzung ständig, abhängig davon, wie gerade Nahrung verdaut und absorbiert wird. Die Leber muß auch die Konzentration vieler Substanzen aufrecht erhalten, die über den Blutkreislauf anderen Geweben zugeführt werden. In diesem Zusammenhang beeinflussen zahlreiche Hormone die Leberfunktion. Man fand heraus, daß die Konzentration vieler Leberenzyme stark von Veränderungen der Nahrung, dem hormonalen Gleichgewicht im Blut und von Stoffwechselprodukten in der Leberpfortader abhängt. In einem wichtigen Punkt unterscheidet sich die Enzyminduktion von ähnlichen Enzyminduktionen bei Bakterien. Entfernt man während der exponentiellen Wachstumsphase einer Bakterienpopulation den Induktor, bleibt das Enzym, das vor Wegnahme des Induktors induziert wurde, weiterhin stabil. In der Leber ist das Gegenteil der Fall (Abb. 4.10). Dies ist nicht weiter überraschend, da sich Bakterien rasch teilen und dabei die Konzentration des induzierten Enzyms herabsetzen können, während die Leberzellen dazu nicht so rasch fähig sind, da sie 160–400 Tage alt werden. Wenn das Wachstum der Bakterien aufhört, und ihre Enzyme nicht mehr aufgeteilt und damit verdünnt werden können, setzt ein Proteinturnover ein, und die induzierten Enzyme werden jetzt abgebaut.

Die Abnahme der Enzymaktivität (vgl. Abb. 4.10) könnte man auf einen Umbau des Enzyms in eine inaktive Form oder auf einen echten Abbau des Moleküls in einzelne Aminosäuren zurückführen. Man kennt Beispiele für Enzymaktivierung bzw. -inaktivierung durch »Induktoren oder Repressoren«. Sie werden

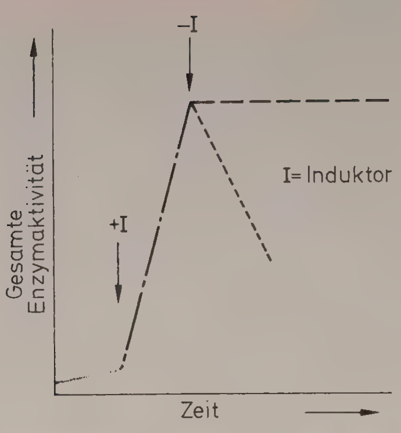


Abb. 4.10: Der schematisierte Kurvenverlauf nach der Enzyminduktion bei Bakterien (- - -) und Leberzellen der Säugetiere (. . .) zeigt die unterschiedliche Stabilität der induzierten Enzyme

in Abschnitt 4.6 besprochen. Es gibt auch deutliche Unterschiede im turnover der zellulären Bestandteile und einen echten Abbau der Enzymmoleküle. Dies ist das Ergebnis eines Experimentes, bei dem man Versuchstieren zunächst radioaktive Aminosäuren und danach wieder unmarkierte Nahrung verfütterte. Man maß dann die abnehmende Radioaktivität in verschiedenen Bestandteilen der Leber. Nach Tabelle 4 variieren die Halbwertszeiten verschiedener Enzyme und Organellen beträchtlich und sind oft viel kürzer als die Zeitdauer einer Zellgeneration. Der turnover ist mit Sicherheit ein intrazellulärer Vorgang und unabhängig vom turnover der Zellen in ihrer Gesamtheit. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten weisen weiter darauf hin, daß es sich um einen spezifischen und streng regulierten Vorgang handelt. Ein Induktor könnte die Veränderung der spezifischen Aktivität eines Leberenzyms nicht nur dadurch hervorrufen, daß er die Syntheserate steigert, sondern auch durch Veränderungen der Abbaurate. Bei der Induktion der Tryptophan-Pyrrolase (oder Oxygenase) wird besonders deutlich, wie verschiedene Induktoren auf diese beiden Arten wirken. Schimke und seine Mitarbeiter haben das Enzym untersucht und ausführlich über Kontrollmechanismen bei Säugetieren auf der Ebene der Enzyme berichtet [26].

Tab. 4: Turnover-Raten von verschiedenen Bestandteilen der Rattenleber. Nach [26].

Zellfraktion oder Enzym	$t^{1/2}$ (Tage)
Gesamtes Homogenat	3,3
Kern	5,1
Mitochondrien	6,8
Lysosomen	7,1
Überstand	5,1
Plasmamembran	1,8
Glutamat/Alanin Transaminase	2–3
Tyrosin Transaminase	0,1
Katalase	1,4
Arginase	4,5

Man kann die spezifische Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber von Ratten, denen zuvor die Nebenniere entfernt wurde, künstlich erhöhen. Die geschieht, indem man den Tieren Tryptophan oder Hydrocortison einspritzt (Abb. 4.11). Da die beiden Induktoren synergistisch wirken, unterliegen sie verschiedenen Mechanismen. Es ist gleichgültig, durch welchen Induktor die Pyrrolasemoleküle synthetisiert wurden, denn beim immunologischen Test reagieren sie gleich. Die jeweilige Steigerungsrate der spezifischen Aktivität ist ähnlich und hängt von der gebildeten Menge des immunologisch aktiven Proteins ab. Man untersuchte mit ^{14}C-Leucin die Einbauraten in die gesamte lösliche Proteinfraktion der Zelle und speziell in die Tryptophan-Pyrrolase. Tryptophan hat auf die Syntheserate des Enzyms keine Wirkung, Hydrocortison dagegen steigert die Syntheserate. Nach diesem Ergebnis müßte Tryptophan die Abbaurate der Tryptophan-Pyrrolase beeinflussen. Diese Hypothese wurde inzwischen überprüft und auch bestätigt (Abb. 4.12). Von den beiden Induktoren des Enzyms wirkt also einer, indem er die Syntheserate steigert (Hydrocortison), der andere, indem er die Abbaugeschwindigkeit verringert (Tryptophan). Über die molekularen Einzelheiten des Abbaus ist außer der hohen Spezifität nichts bekannt. Die außerordentliche Spezifität des Enzymabbaus konnte man durch Untersuchungen bei einer Reihe von Mäusestämmen zeigen, als man die Katalasekonzentration in Leber und Niere beobachtete. 1920 trat in der Mäusezucht des Rockefeller Institutes in New York eine Mutante auf. Die Linien C 57 und C 58 sind Nachkommen dieser Mutante. Ihre normale Katalaseaktivi-

tät ist in der Niere und Leber nur halb so hoch. Über die weitere Entwicklung dieser Mäuse liegt eine ausführliche Beschreibung vor [2]. Sie ist ein eindrucksvolles Beispiel dafür, welche Umwege in der wissenschaftlichen Forschung oft gemacht werden. 1940 ging aus der Linie C 57 ein weiterer Stamm hervor, der in

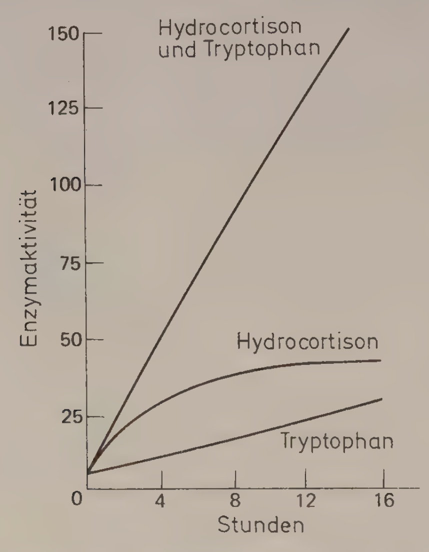


Abb. 4.11: Induktion der Tryptophanpyrrolase durch Tryptophan und Hydrocortison bei Ratten, denen zuvor die Nebenniere entfernt wurde. Nach [26]

der Leber wieder die normale Katalaseaktivität zurückgewonnen hatte, aber in der Niere nach wie vor nur die Hälfte der normalen Katalaseaktivität besaß. Man hat diese beiden Mutanten genetisch untersucht und hat auch die Syntheserate der Katalase und den Enzymabbau bei jeder Linie biochemisch erforscht. Daraus ergab sich, daß in jedem Gewebe mindestens zwei Gene die Katalaseaktivität bestimmen. Eines der Gene, das Gen CS, ist das Strukturgen für die Katalase. Eine Mutation in diesem Gen hatte zu den Linien C 57 und C 58 geführt. Diese Mutation verringerte die katalytische Aktivität des Moleküls um die Hälfte; deshalb änderte sich auch die spezifische Aktivität. Das zweite Gen, Gen Ce, kontrolliert die Abbaugeschwindigkeit der Katala-

se in der Leber, nicht dagegen in der Niere. Eine Mutation in diesem Gen führte zu der zweiten Mutantengruppe. Ihr normaler Katalasespiegel in der Leber geht nicht auf eine wiederhergestellte katalytische Wirkung des Proteins zurück, sondern die Abbaurate ist bei ihr in der Leber um die Hälfte verringert, so daß die doppelte Anzahl der Moleküle vorhanden bleibt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit gibt es Abbaumechanismen, die proteinspezifisch (z. B. für Katalase) und gewebespezifisch wirken. Wenn alle Proteine, die in der Leber umgesetzt werden, ein spe-

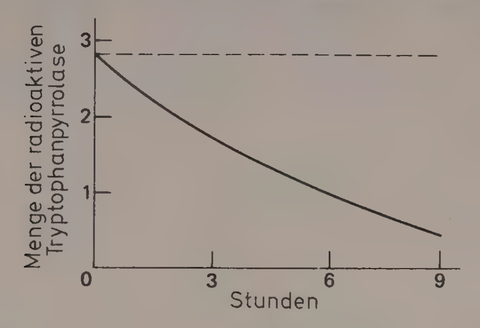


Abb. 4.12: In vivo-Effekt von Tryptophan auf die Stabilität der Tryptophanpyrrolase. Den Ratten, die radioaktives Enzym enthielten, wurde bei t = O-Saline (- - -) oder Tryptophan (——) eingesprizt. Nach [26]

zifisches Kontrollprotein für ihre Abbaurate hätten, würde sich daraus logischerweise eine groteske Situation ergeben; um ein Protein abzubauen, ist ein Protein notwendig, um diese abzubauen, wieder eines ... ad inf. Man kann sich ein Schema vorstellen, bei dem das Gen Ce einen lysosomalen Erkennungsbereich kontrolliert. Dieser wiederum kann eine Reihe von Proteinen absorbieren und unterschiedlich fest an sich binden, je nachdem, welche Struktur die Proteine jeweils besitzen. (Die Tertiärstruktur würde also für die Halbwertszeit der Proteine eine Rolle spielen.) Solche Spekulationen sind jedoch wenig sinnvoll, solange keine stichhaltigen Beweise vorliegen. Gewebespezifische Faktoren kontrollieren auch die Abbaurate der Lactatdehydrogenase. Das dargestellte Problem ist also kein Einzelfall.

Die gewebespezifische Kontrolle des Proteinabbaus ist ein Beispiel für eine extreme Veränderung der Enzymaktivität. Sie paßt die Enzymsynthese den jeweiligen Bedingungen in der Zelle an. Es gibt noch andere, weniger einschneidende gewebespezifische

Veränderungen der Proteine. Mit diesen werden wir uns im folgenden Abschnitt beschäftigen.

4.5. Veränderungen der Proteine

Wenn man zelluläre Enzyme reinigt, ist es nicht ungewöhnlich, daß man unterschiedliche und trennbare Fraktionen findet, die dieselbe katalytische Aktivität besitzen. Solche Enzyme nennt man »Isoenzyme«. Es gibt mindestens 100 Beispiele, bei denen Enzyme in mehreren molekularen Formen vorliegen. Isoenzyme entstehen durch verschiedene Mechanismen. Entweder sind es durch Enzyme gesteuerte Veränderungen irgend welcher Art, oder stellen sie zeit- und gewebeabhängige Veränderungen im Proteinmuster dar.

Hämoglobin ist genau genommen kein Enzym, aber es ist ein gutes Beispiel für eine zeitabhängige Veränderung im Isoenzymmuster. Man kennt mindestens vier Strukturgene, die α-, β-, γ- und δ-Polypeptidketten des Hämoglobins codieren. Diese Gene sind in verschiedenen Entwicklungsstufen des Organismus aktiv. Ihre relative Aktivität bestimmt die relative Menge der unterschiedlichen Hämoglobinmoleküle. Im Fötus der Säugetiere besteht Hämoglobin aus 2α- und 2γ-Ketten ($\alpha_2\gamma_2$). Zum Zeitpunkt der Geburt ändert sich die Zusammensetzung; sie besteht jetzt vorwiegend aus $\alpha_2\beta_2$-Molekülen und einigen Prozent $\alpha_2\delta_2$-Molekülen. Das Aktivitätsmuster der Gene wird selbst auch genetisch kontrolliert und kann durch Mutation beeinflußt werden. Bei Thalassämie, einer erblichen Blutkrankheit, können keine β-Ketten gebildet werden und folglich auch keine $\alpha_2\beta_2$-Moleküle. Menschen mit dieser Krankheit leben aber trotzdem weiter, da bei ihnen fortlaufend $\alpha_2\gamma_2$-Moleküle und mehr als gewöhnlich $\alpha_2\delta_2$-Moleküle gebildet werden. Sie leiden unter Anämie, da ihr Blut weniger Sauerstoff binden und transportieren kann. $\alpha_2\gamma_2$-Moleküle sind nämlich nicht so gut an die Luftatmung angepaßt wie $\alpha_2\beta_2$-Moleküle, die normalerweise das Adulthämoglobin darstellen. Dagegen entsprechen die $\alpha_2\gamma_2$-Moleküle besser als das $\alpha_2\beta_2$-Hämoglobin den Bedürfnissen des Fötus. Sie müssen den Sauerstoff vom mütterlichen auf den fötalen Blutkreislauf übertragen. Die Aminosäuresequenzen der Polypeptide sind einander ähnlich. Mit ziemlicher Sicherheit sind sie während der Evolution durch Genduplikation entstanden. Die vorhandenen Isoenzyme bilden eine bestechende und elegante Lösung für die verschiedenen phy-

siologischen Anforderungen, die während der Ontogenese auftreten.

Bei der Lactat-Dehydrogenase (LDH) besteht für das Isoenzymmuster nicht nur eine zeitliche Abhängigkeit, die Veränderungen sind auch vom Gewebe abhängig. Wie Hämoglobin ist auch LDH ein Tetramer, das aus zwei verschiedenen Typen von Polypeptiden besteht. Aber anders als beim Hämoglobin können sich die Polypeptide (A und B Ketten) in jedem Verhältnis zusammenlagern und ein enzymatisch aktives Tetramer bilden. Es sind also fünf LDH-Moleküle mit folgender Zusammensetzung möglich:

LDH-1 = B_4, LDH-2 = A_1B_3, LDH-3 = A_2B_2 , LDH-4 = A_3B_1 und LDH-5 = A_4

Da die Moleküle offensichtlich thermodynamisch gleich stabil sind, stellt das Verhältnis der LDH Isoenzyme in der Zelle das relative Verhältnis der A und B Ketten dar, wie es zum Zeitpunkt der Zusammenlagerung bestand. Man kann die LDH Isoenzyme in Stärkegelen elektrophoretisch trennen und anschließend die Lage der aktiven Enzyme mittels einer zytologischen Färbung bestimmen (Abb. 4.13). Das gebildete Formazan ist stark gefärbt und unlöslich. Da die einfache Methode auch geringe Mengen nachweist, kann man damit in vielen Gewebeextrakten rasch und zuverlässig ihren LDH Gehalt bestimmen (Abb. 4.14). Die angefärbte Gelmenge ist der Konzentration des jeweiligen Isoenzyms proportional, und man sieht, daß die Verteilung in den verschiedenen Geweben stark voneinander abweicht. Man hat LDH-1 und LDH-5 Isoenzyme aus solchen Gelen isoliert, im Verhältnis 1:1 gemischt und dann durch Einfrieren in einer Pufferlösung die Moleküle disoziiert. Als man nun durch langsames Auftauen eine erneute Zusammenlagerung der Ketten ermöglichte, traten die fünf Isoenzyme im Verhältnis 1:4:6:4:1 auf, genau

Lactat NAD Reduziertes PMS Tetrazolium-chlorid
LDH
Pyruvat $NADH_2$ PMS Formazan

Reaktionsgleichung:
Lactat + Tetrazoliumchlorid = Pyruvat + Formazan

Abb. 4.13: Zytologischer Nachweis der LDH-Aktivität
PMS = *P*henazin*m*ethyl*s*ulfat, ein synthetischer Elektronencarrier

so, wie man es von einer zufälligen Kombination der A und B Ketten erwartet, die in gleicher Anzahl vorliegen. Die relative Unabhängigkeit der fünf Isoenzyme in verschiedenen Geweben steht also fest. Wenn man nun in den Geweben Binomialverteilungen vorfindet, bei denen das 1:4:6:4:1 Verhältnis verschoben ist, liegt es nahe, daß sich die A und B Ketten wohl nach statistischer Verteilung zusammenlagern, aber nicht in gleicher Anzahl vorliegen. Aus einem Verteilungsmuster, wie z. B. in Abb. 4.14, läßt sich die relative Aktivität der Gene ableiten, mit der sie A und B Ketten codieren.

Untersuchungen der Isoenzymmuster desselben Gewebes zu verschiedenen Entwicklungszeiten haben außerdem ergeben, daß es zeit- und gewebeabhängige Veränderungen im Isoenzymmuster gibt (Abb. 4.15). Die Verteilung beim ausgewachsenen Tier ist also nur das letzte Stadium charakteristischer Veränderungen, die während der Zelldifferenzierung erfolgen. Die Veränderungen sind reproduzierbar, und es ist offensichtlich, daß jedes Isoenzym eine eigene, spezifische Funktion zu erfüllen hat. Solche spezifische Funktionen bestehen nicht nur in adulten Zellen, sondern auch schon während den verschiedenen Entwicklungsstadien zum endgültigen Zelltyp. Bei den meisten Wirbeltieren findet man nach der Pubertät im Hodengewebe ein zusätzliches Isoenzym (Abb. 4.14 c, seine Lage ist durch den Kreis gekennzeichnet.) Das Enzym hängt mit der Produktion von Spermatocyten zusammen und spielt wahrscheinlich bei der Spermatogenese eine spezifische Rolle, da in Eiern und frühen Teilungsstadien

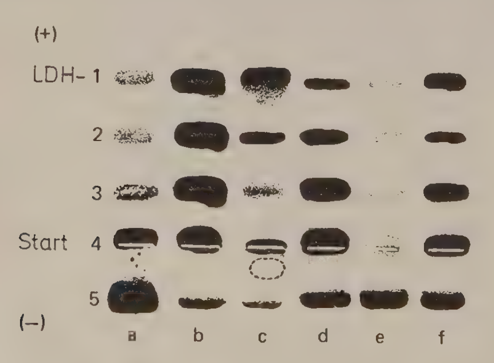


Abb. 4.14: Verteilung der LDH-Isoenzyme in verschiedenen Rattengeweben. a = Skelettmuskel, b = Herzmuskel, c = Hoden, d = Zunge, e = Lunge, f = Gehirn. Nach [27]

nur LDH-1 vorkommt. Das zusätzliche Isoenzym LDH_x scheint eine dritte Art von Polypeptidketten zu besitzen. Seine Synthese zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen verändertem Isoenzymmuster und veränderter Zellfunktion.

Ändert sich während der Entwicklung eines Tieres die Zusammensetzung des Hämoglobins, kann man dies teilweise den wechselnden physiologischen Bedingungen zuschreiben und außerdem der Tatsache, daß sich die verschiedenen Hämoglobine in ihrem Redoxpotential unterscheiden. Ebenso kann man erklären, warum sich das Isoenzymmuster während der Zelldifferenzierung verändert. Es reflektiert die verschiedenen Bedingungen in der Zelle und/oder reflektiert es unterschiedliche Stoffwechselerfordernisse während der Differenzierung. LDH-1 und LDH-5 unterscheiden sich in ihrer Kinetik deutlich, wenn sie mit NAD oder einer entsprechenden Substanz reagieren. Bei verschiedenen Substraten mit unterschiedlichem pH haben sie nicht dieselben K_m-Werte, und durch Pyruvat werden die beiden Isoenzyme unterschiedlich stark gehemmt.

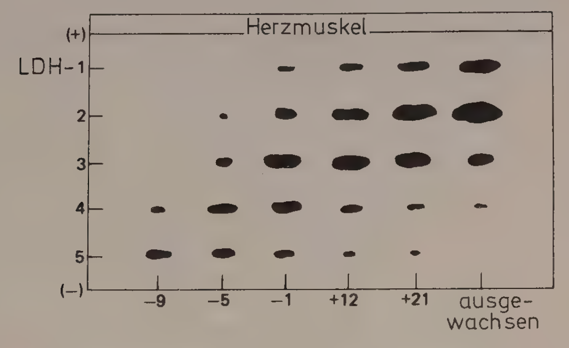


Abb. 4.15: Veränderungen im LDH-Isoenzymmuster des Herzgewebes während der Ontogenese der Maus; ganz links = 9 Tage vor der Geburt; ganz rechts = ausgewachsenes Tier; O = Geburt. Nach [27]

Bei einer 0,01 molaren Pyruvatkonzentration wird die Aktivität der LDH-1 bis zu 80 % gehemmt, während LDH-5 noch 100 prozentig aktiv ist. Die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung drängt sich geradezu auf. Man weiß, daß die Pyruvatkonzentration in Skelettmuskeln stark schwankt, im Herzmuskel dagegen viel konstanter bleibt, – außerdem kommt im Herz-

muskel vorwiegend LDH-1 und im übrigen Muskelgewebe besonders das Isoenzym LDH-5 vor (Abb. 4.14, a und b). Obwohl diese Erklärung sehr überzeugend klingt, wurde sie aus folgendem Grund angefochten: Man kann die unterschiedliche Inhibitorwirkung des Pyruvats nur beobachten, wenn das Enzym in extrem niedriger Konzentration (ungefähr 10^{-8} M) vorliegt. Wird das Enzym in höherer Molarität (ungefähr 10^{-5} M) eingesetzt, wie es den Gegebenheiten in der Zelle eher entspricht, lassen sich keine unterschiedlichen Hemmwirkungen mehr feststellen [28]. Weil die Werte der Enzymkinetik nicht konstant sind, sondern stark von der Enzymkonzentration abhängen, bleibt die physiologische Bedeutung nach wie vor offen, und die Untersuchungen zur Enzymkinetik werden teilweise in Frage gestellt. Normalerweise führt man die Versuche bei niedriger Enzymkonzentration (10^{-7} bis 10^{-9} M) und hoher Substratkonzentration (10^{-3} bis 10^{-1} M) durch. Inzwischen weiß man jedoch, daß die Konzentrationen bei wichtigen Biosynthesen für Enzym, Substrat und Effektor innerhalb der Zelle in etwa gleich sind (ungefähr 10^{-9} M) [29]. Die Enzymkinetik sollte nochmals eingehend untersucht werden. Bis dahin bleibt abzuwarten, ob man die bisherigen biochemischen Vorstellungen von Grund auf neu durchdenken muß, – wenn die LDH diesbezüglich keine Ausnahme darstellt, könnte dies sehr wohl notwendig werden.

Die A und B Polypeptide der LDH besitzen, soweit man bis heute weiß, keine eigene Enzymaktivität. Es gibt aber auch andere Beispiele, bei denen zwei Proteine sich gegenseitig beeinflussen und ihre jeweiligen enzymatischen Eigenschaften verändern; jedes einzelne von ihnen kann aber auch allein als Enzym wirken. Dafür ist die Lactose-Synthetase wohl das beste Beispiel [30]. Lactose-Synthetase kommt in den Milchdrüsen der Säugetiere vor und ist an folgender Reaktion beteiligt: UDP-Galaktose + Glukose = Lactose + UDP. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, die man (leider) auch A und B Untereinheiten nennt. Die A Untereinheit ist selbst auch ein Enzym und kommt in allen Membranen des ER vor. Sie katalysiert dort die Synthese der substituierten Lactosamine, die selbst wiederum eine Strukturkomponente vieler Glycoproteine sind. *In vitro* kann man diese Reaktion nachvollziehen: UDP-Galaktose + N-Acetylglukosamin = UDP + N-Acetyllactosamin. Die B Untereinheit kommt ebenfalls unabhängig als α-Lactatalbumin in der Milch vor. Sie ist Hauptbestandteil der Molke. Von α-Lactatal-

bumin, der B Untereinheit, kennt man keine eigentliche Aktivität, aber es hemmt die Aktivität des A Proteins für N-Acetyllactosamin und aktiviert die Lactose-Synthetase. Nach ihrer Anatomie und Entwicklungsgeschichte leiten sich die Milchdrüsen von den Talgdrüsen der Haut ab. Man erwartet deshalb, daß ihre Zellen ein ausgedehntes Membransystem für die Sekretion besitzen. Gegen Ende der Schwangerschaft tritt an diesen Membranen eine starke Oberflächenvergrößerung (Proliferation) auf. Gleichzeitig wird sehr viel A Protein synthetisiert, das für die Glycoproteinsynthese der Membranen notwendig ist. Die Hormone Insulin, Hydrocortison und Prolactin kontrollieren gemeinsam diesen Vorgang. In Zellkulturen kann man ihn *in vitro* mit diesen Hormonen nachvollziehen. Bei der Geburt nimmt der Progesteronspiegel im mütterlichen Blut ab, und gleichzeitig werden sehr viele B Untereinheiten (α-Lactatalbumine) gebildet. Das neugebildete Protein wird ins Lumen des ER abgeschieden, dann zum Golgi Apparat transportiert und dort in Vesikel eingeschlossen, deren Wand das A Protein enthält. Nun kann die Synthese der Lactose erfolgen. Die Flüssigkeit, die zuletzt von den Zellen abgegeben wird, enthält sowohl Lactose als auch α-Lactatalbumin. Das ganze System ist ein Beispiel dafür, auf welche komplexe Weise Protein-Protein Wechselwirkungen die Enzymaktivität beeinflussen können. Sie stellen die ausgewogene Synthese von Lactose und α-Lactatalbumin für die Milchproduktion sicher. Außerdem haben wir ein System vor uns, bei dem Hormone eine Schlüsselfunktion besitzen. Sie kontrollieren die Oberflächenvergrößerung der Membranen, die Proteinsynthese und den Kohlehydratstoffwechsel. Für die größte Überraschung sorgte jedoch die Entdeckung, daß die Aminosäuresequenz von α-Lactatalbumin und Lysozym im Wesentlichen identisch ist. Lysozym kommt in der Tränenflüssigkeit vor und baut die Mureinkomponente der Bakterienzellwand ab. Auf Grund dreidimensionaler Modelle, die man nachgebaut und untersucht hat, erkannte man, daß sich α-Lactatalbumin und Lysozym in ihrer Tertiärstruktur sehr ähnlich sind. Wahrscheinlich stammen die beiden Proteine von einem gemeinsamen »Urpolypeptid« ab. Dieses Ergebnis kann man selbstverständlich auch rational erklären, da Lysozym ebenfalls in einer umgewandelten Talgdrüse entsteht und sein Substrat chemisch gesehen unter anderem mit Lactose verwandt ist. Aber kein Biochemiker hätte die strukturellen Ähnlichkeiten voraussagen können, ehe man sie nicht untersucht und nachge-

wiesen hatte. Wenn in Zukunft noch mehr Proteinstrukturen aufgeklärt werden, können sowohl die an der Zelldifferenzierung Interessierten, als auch die Evolutionsforscher weitere Überraschungen erwarten.

Isoenzyme können auch durch Veränderung intakter Proteine entstehen. Die Anlagerung von Kohlehydratgruppen an die Proteine im Golgi Apparat wurde bereits erwähnt (vgl. S. 73). Wenn Glykosidasen oder andere Enzyme den Kohlehydratanteil verändern, können eine ganze Reihe neuer Glykoproteine entstehen. Werden Proteine durch Oxydation verändert, z. B. die Malat-Dehydrogenase, und werden Glutamin und Asparagin desaminiert, z. B. bei den Proteinen der Augenlinse, können vielfältige Formen biologisch aktiver Proteine entstehen.

Natürlich sind Isoenzyme in einigen Fällen auch ganz verschieden und unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz und -zusammensetzung. Man lernt immer mehr Beispiele kennen, bei denen reversible Phosphorylierungen stattfinden, die selbst durch Enzyme katalysiert werden. Die kovalente Enzymstruktur kann auch durch Adenylgruppen, Acetylierung oder ähnliche Prozesse verändert werden. Diese Vorgänge lösen in der Folge oft Veränderungen im Polymerisationsgrad der Enzyme aus. Sie sind in der Regel leicht reversibel und für das Verhalten der Enzyme im Stoffwechsel so wichtig, daß man sie besser im Zusammenhang mit der »Regulation des Gesamtstoffwechsels« als unter dem Kapitel »Proteinstruktur« behandelt.

4.6. Stoffwechsel und Synthese von Makromolekülen

Während der Differenzierung ist die Synthese eines neuen Zellbestandteiles selten ein in sich abgeschlossener Vorgang, vielmehr wird dabei der Stoffwechsel der Zelle beeinflußt und die Funktion entsprechend geändert. Es gibt selbstverständlich auch andere Fälle, z. B. die Hämoglobinsynthese und die Synthese des Muskelproteins, bei denen mit der eigentlichen Proteinsynthese der Vorgang weitgehend abgeschlossen ist. In der Regel bestehen jedoch zwischen einem veränderten Zellstoffwechsel und der differentiellen Genaktivität Zusammenhänge, die wir in diesem Abschnitt besprechen werden. Bei den Enzymen der Glykolyse (Abb. 4.16) besteht ein Zusammenhang zwischen der Enzymmenge im Gewebe und der maximalen Glykolyserate. Auffallend ist jedoch, daß sehr viele Enzyme in 10–100facher Menge der ma-

ximalen Glykolyserate vorliegen. Im Verlauf des Stoffwechsels muß es zu irgend einem Zeitpunkt einen Schritt geben, der die Glykolyserate begrenzt. Vielleicht ist es sogar das Enzym selbst, das den Vorgang katalysiert und das normalerweise im Überschuß vorhanden ist. (Bei der Glykolyse ist gewöhnlich Phosphofructokinase der limitierende Faktor). Man kann die unterschiedliche Enzymsynthese während der Zelldifferenzierung (vgl. Abb. 4.16), die zur Ausbildung verschiedener Gewebe führt, nur sehr schwer rational erklären. Es ist bestimmt irreführend, wenn man versucht, Enzymgehalt und Enzymaktivitäten einer Zelle in scharf begrenzten Abschnitten oder Phasen darzustellen. Vielmehr schwankt während der Glykolyse die Konzentration der Zwischenprodukte innerhalb eines bestimmten Bereiches. Für die oszillatorischen Konzentrationsänderungen sind einige Enzyme der Glykolyse im Überschuß nötig [32]. Alles in allem ist es weniger wichtig, ob die Glykolyse mit einer bestimmten Geschwindigkeit verläuft und ob die Enzyme effektiv eingesetzt werden, vielmehr, daß die Aktivität der Glykolyse in der Zelle entsprechend kontrolliert und in den gesamten Stoffwechsel integriert werden kann. Zwischen der spezifischen Aktivität der glykolytischen Enzyme besteht offenbar keine Beziehung (Abb. 4.16), wohl aber zwischen den jeweils synthetisierten *Proteinmengen*. Bei der Hefe liegen die Normalitäten der Glykolyse-Enzyme in einfachen numerischen Proportionen vor (1:2:4:8), im Bereich von 2,5 bis 20 $\times$ 10^{-5}N [32]. (Normalität = molare Enzymkonzentration/Anzahl der Bindungsorte des Substrates) Es ist wich-

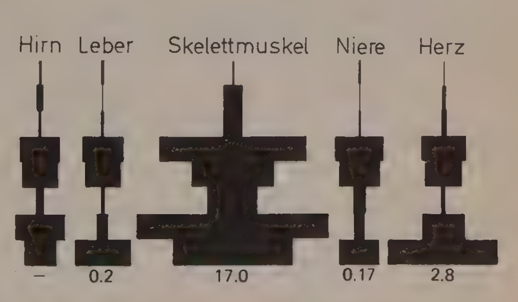


Abb. 4.16: Aktivität der glykolytischen Enzyme in Rattengeweben. Die Enzymaktivität ist proportional zur Balkenbreite. Die Aktivität der Phosphofruktokinase im Herzmuskel beträgt 20 μmol/g Frischgewicht des Gewebes. Die Maximalwerte der Glykolyse sind ebenfalls in dieser Einheit angegeben. Nach [31]

tig, daß die synthetisierte Proteinmenge kontrolliert werden
wenn erst einmal ein Minimum der Konzentration erreicht ist.
kann. Die katalytische Aktivität ist demgegenüber zweitrangig,
Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Proteinmenge ergab sich aus den intrazellulären Enzym- und intrazellulären Substratkonzentrationen, die in ähnlichen Größenordnungen vorliegen. Wenn eine große Menge Protein neu synthetisiert wird, kann sich dies auf den Pool der freien Stoffwechselprodukte stark auswirken. Dazu können sowohl die Fähigkeit des Proteins, andere Stoffwechselprodukte zu binden, als auch seine katalytischen Fähigkeiten beitragen. Man schätzt den freien Oxalacetat-Pool in den Mitochondrien auf 5 μN. (Dieser Wert für Oxalacetat ergab sich, nachdem die Proteine der Mitochondrien mit Perchlorsäure denaturiert wurden.) Die Konzentration der Oxalacetat – Bindungsorte beträgt in einem Mitochondrium mindestens 400 μN. Die wirkliche Konzentration an »freiem« Oxalacetat liegt bestimmt weit unter 5 μN. Wenn sich eine Zelle differenziert, könnte ein Protein des Mitochondriums, das der Konzentration an Oxalacetat-Bindungsorten hinzugefügt wird, Auswirkungen haben, die mit der eigentlichen Enzymaktivität des Proteins nicht zusammenhängen. Es ist allgemein bekannt, daß Proteine eine Pufferwirkung besitzen. Sie wirken als Puffer sicherlich anders als H^+-Ionen. Solange man über die Faktoren, die den Stoffwechsel der Zelle regulieren, nicht mehr weiß, kann man auch schlecht über den Zusammenhang diskutieren, der zwischen den veränderten Synthesemustern der Makromoleküle während der Differenzierung und den veränderten Stoffwechselkapazitäten einer ausdifferenzierten Zelle besteht. Aus der bisherigen Diskussion kann man nicht folgern, ob ein einfacher oder unmittelbarer Zusammenhang besteht. Die wenigen Arbeiten, die es zu diesem Thema gibt, weisen darauf hin, wie komplex und vielschichtig das Problem ist (vgl. S. 36).

Bei Säugetieren wird die Glykogenmenge in der Leber durch die Aktivität der Glykogen-Synthetase und der Phosphorylase kontrolliert. Synthetase katalysiert die Glykogen-Synthese und Phosphorylase den Abbau von Glykogen zu Glukose-1-Phosphat. Von beiden Enzymen gibt es zwei Zustandsformen, die sich in ihrer Aktivität, im regulatorischen Verhalten und im Grad ihrer Phosphorylierung unterscheiden. Das Enzym, das die Phosphorylierung der Phosphorylase katalysiert (Abb. 4.17), kommt ebenfalls in zwei Formen vor. Sie unterscheiden sich in ihrer Enzym-

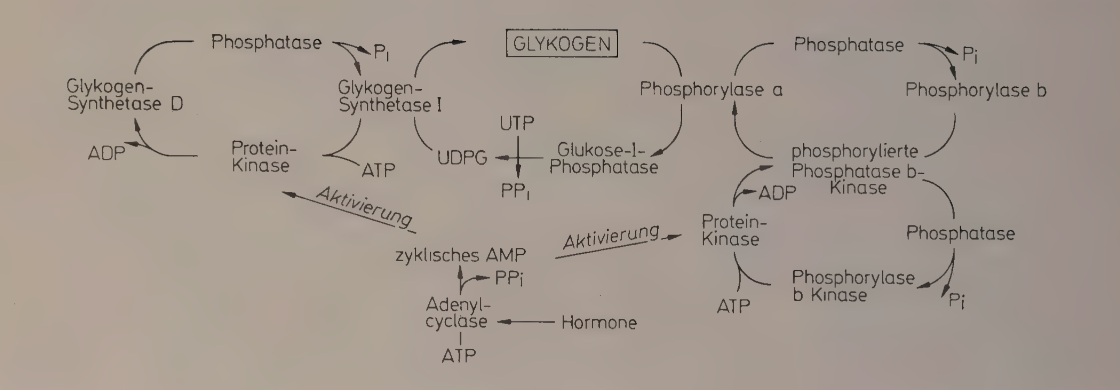


Abb. 4.17: Kontrollmechanismen für den Glykogenspiegel in Leberzellen der Säugetiere. Phosphorylase b und Glykogen-Synthetase-D sind keine inaktiven Enzyme, sondern unterscheiden sich nur im regulatorischen Verhalten. Wenn die Glykogen-Synthease in der I-Form vorliegt, befindet sich die Phosphorylase in der b-Form. Einen Kontrollmechanismus, bei dem sich die Enzyme gegenseitig beeinflussen (im obigen Beispiel Phosphorylase und Glykogen-Synthese), nennt man »Kaskaden-Regulation«. Kleine Veränderungen in der Hormonkonzentration werden bei dieser Regulation verstärkt.

aktivität und im Grad der Phosphorylierung. Der allgemein verbreitete Regulator cAMP ist auch an einigen Reaktionen des obigen Schemas beteiligt, welches außerordentlich gut untersucht zu sein scheint. Einerseits regulieren Gene durch ihre Aktivität die Proteinmengen, die in einer Leberzelle während der Differenzierung gebildet werden, andererseits benötigt eine Leberzelle eine bestimmte Menge Protein, um ihren Glykogenspiegel zu regulieren. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Vorgängen liegt noch völlig im Dunkeln. Obwohl die beschreibende Anatomie der Zelldifferenzierung im molekularen Bereich große Fortschritte macht, steht man bei den dynamischen Aspekten dieser Vorgänge und der biochemischen Kausalanalyse noch am Anfang. Wahrscheinlich ist cAMP an der Phosphorylierung beteiligt und damit an der Regulation zahlreicher Proteine, angefangen beim Histon (vgl. S. 56) bis hin zur Phosphorylase. Man kennt auch schon einige Hormone, die die Synthese von cAMP stimulieren. Die bisherigen Ergebnisse sind aber nicht viel mehr als ein vager Hinweis darauf, wie die Zusammenhänge wirklich sind.

Zusammenfassung

Während der Zelldifferenzierung verändert sich Ausmaß und Geschwindigkeit, mit der ein Stoffwechselprodukt ›A‹ in ein Stoffwechselprodukt ›B‹ umgewandelt wird. Als Folge dieser Vorgänge verändern sich auch Struktur und Funktion der Zelle. Mit diesen Veränderungen befaßt sich die Zelldifferenzierung. In Abb. 4.18 sind die möglichen Ebenen eingezeichnet, auf denen die Umwandlung von ›A‹ zu ›B‹ kontrolliert werden könnte. Mit den neun Punkten sind keineswegs alle Möglichkeiten ausgeschöpft. Die große Aufgabe, vor der die Entwicklungsbiologen stehen, kann man erst richtig einschätzen, wenn man auch folgendes berücksichtigt: Der begrenzende Faktor für Ausmaß und Geschwindigkeit des Biosyntheseschrittes kann sich im Lauf der Zeit ändern oder er kann gleichzeitig in verschiedenen Zellen eines Gewebes unterschiedlich sein. Zweifellos muß man vereinfachen und verallgemeinern, und es ist unnötig, das Problem, wie es in Abb. 4.18 dargestellt wurde, für alle ›A‹ und alle ›B‹ in allen Zellen und für sämtliche Entwicklungsstadien zu lösen. Trotz der großartigen Erfolge, die wir bei der Erforschung der Zelldifferenzierung verzeichnen können, bleibt doch sehr viel von der Ehrfurcht, die bereits Aristoteles bewies, als er über das Thema schrieb.

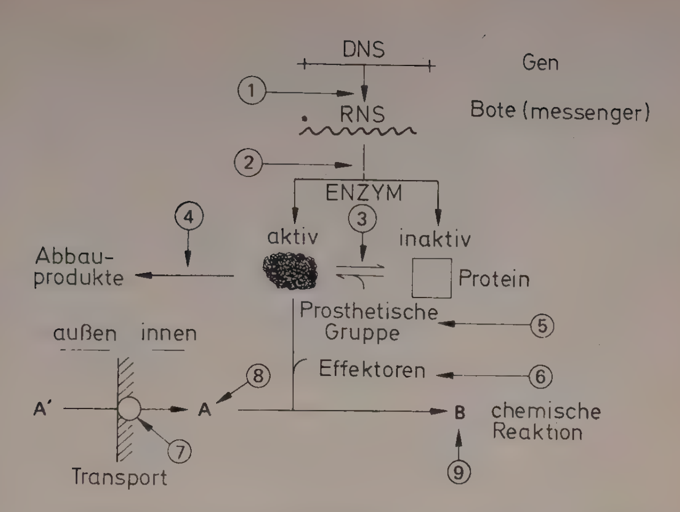


Abb. 4.18: Mögliche Kontrollen der Regulation während der Zelldifferenzierung. Die Verbindung A wird beim Stoffwechsel in die Verbindung B umgewandelt. 1 = Transkription, 2 = Translation, 3 = Veränderung am Molekül, 4 = Proteinabbau, 5 = Konzentrationsänderung der Prosthetischen Gruppe, 6 = Konzentrationsänderung der Effektoren, 7 = Transportphänomene, 8 = Konzentrationsänderungen des Ausgangsproduktes, 9 = Konzentrationsänderung des Endproduktes

Literatur

1. Barth, L. J.: Development: Selected topics, Addison Wesley, London (1964)
2. Paigen, K.: In Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems, Karger, Basel, 1–46 (1971)
3. Callan, H. G.: J. Cell Sci., 2, 1–7 (1967)
4. Thomas, C. A.: In The Neurosciences: Second Study Program, Rokkefeller University Press, New York, 973–998 (1970)
5. Ris, H. and Kubai, D. F.: Adv. in Genetics, 4, 263–294 (1970)
6. Beerman, W.: Chromosoma, 12, 1–25 (1961)
7. Grossbach, U.: Ann. Zool. Fennici., 5, 37 (1968)
8. Huang, R. C. C. and Kleiman, L.: Symp. Soc. Exp. Biol., 25, 93–115 (1971)
9. Paul, J. and Gilmour, R. S.: J. Mol. Biol., 34, 305–316 (1968)
10. Dixon, G. H. and Sung, M. T.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 67, 1616–1623 (1970)
11. Langan, T. A.: Science, 162, 579–580 (1968)
12. Gall, J. and Pardue, M. L.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 63, 378–383 (1969)

13. Brown, D. D. and Dawid, I. B.: Science, 160, 272–280 (1968)
14. Miller, O. L. and Beatty, B. R.: Science, 164, 955–957 (1969)
15. Loening, U. E.: Symp. Soc. gen. Microbiol., 20, 77–106 (1970)
16. Pemberton, R. E., Housman, D., Lodish, H. F. and Baglioni, C.: Nature, 235, 99–102 (1972)
17. Heywood, S. M. and Rich, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 59, 590–597 (1968)
18. Kedes, L. H. and Gross, P.: Nature. 223, 1335–1339 (1969)
19. Kedes, L. H. and Birnsteil, M. L.: Nature, 230, 165–169 (1971)
20. Bishop, J. O., Pemberton, R. and Baglioni, C.: Nature, 235, 231–234 (1972)
21. Harris, H.: Cell Fusion Oxford University Press, Oxford (1969)
22. Felicetti, L., Gambino, R., Metafore, S. and Monroy, A.: Symp. Soc. Exp. Biol., 25, 183–186 (1971)
23. Heywood, S. M.: Nature, 225, 696–698 (1970)
24. Lim, L. and Canellakis, E. G.: Nature, 227, 710–712 (1970)
25. Williamson, A.: In Essays in Biochemistry, 5, 139–175 (1969)
26. Schimke, R. T.: In Current Topics in Cellular Regulation, 1, 77–124 (1969)
27. Markert, C. L. and Ursprung, H.: Developmental Genetics, Prentice-Hall Inc., London (1971)
28. Wuntch, T., Chen, R. F. and Vessell, E. S.: Science, 167, 63–65 (1970)
29. Srere, P. A.: Science, 158, 936–937 and erratum on p. 1556 (1967)
30. Brew, K.: In Essays in Biochemistry, 6, 93–118 (1970)
31. Ashworth, J. M.: Symp. Soc. Exp. Biol., 25, 27–50 (1971)
32. Hess, B., Boiteux, A. and Kruger, J.: In Advances in Enzyme Regulation, 7, 149–167 (1969)

Weitere Literaturhinweise

Einführungen

Newth, D. R.: Animal Growth and Development. Studies in Biology no. 24. Edward Arnold Ltd. (1970)

Barth, L. J.: Development: Selected Topics. Addison-Wesley Publishing Co., Ltd. (1964)

Beide Bücher sind kurze Einführungen in die Embryologie. Sie sind besonders für solche Leser geeignet, die sich zum ersten Mal mit diesem Thema befassen.

Ebert, J. D. and Sussex, I. M.: Interacting Systems in Development. 2nd. edition. Holt, Rinehart und Winston Inc. (1970)

Markert, C. L. and Ursprung, H.: Entwicklungsbiologische Genetik. Gustav Fischer Verlag (1973)

Der Schwerpunkt dieser beiden Bücher liegt im Bereich der Molekularbiologie und Biochemie. Ebert und Sussex befassen sich auch mit der Pflanzenentwicklung, während Markert und Ursprung die Isoenzyme bevorzugt behandeln.

Cohen, G.: Der Zellstoffwechsel und seine Regulation, Vieweg Braunschweig (1972)

Ebert, J. D.: Entwicklungsphysiologie, BLV München (1970)

Heß, D.: Fahrplan der Gene, Kosmos Stuttgart (1972)

Heß, D.: Genetik, Herder Freiburg (1972)

Houillon, Ch.: Embryologie, Vieweg Braunschweig (1972)

Mohr, H. and Sitte, P.: Molekulare Grundlagen der Entwicklung, BLV München (1971)

Nagl, W.: Chromosomen, Goldmann München (1972)

Anspruchsvollere Texte

Balinsky, B. I.: An Introduction to Embryology. W. B. Saunders Co. (1970)

Bodemer, C. W.: Modern Embryology. Holt, Rinehart und Winston Inc. (1968)

Es gibt nur wenige Bücher, in denen die biochemischen Aspekte der Zelldifferenzierung den heutigen Vorstellungen entsprechend behandelt werden. Die beiden folgenden sind als Zusammenfassungen gut geeignet; aber leider gilt dies jeweils nur für den Zeitraum bis zu ihrem Erscheinen.

Deuchar, E. M.: Biochemical Aspects of Amphibian Development. Methuen's Monographs on Biological Subjects. Methuen u. Co., Ltd. (1965)

Brachet, J.: The Biochemistry of Development. Pergamon Press (1960)

Hadorn, E.: Experimentelle Entwicklungsforschung, Springer Berlin (1970)

Wolff, E.: Experimentelle Embryologie – Entwicklungsmechanik –, G. Fischer Stuttgart (1971)

Weitere Hinweise

Zwei ausgezeichnete Bücher mit Originalarbeiten:

Bell, E.: Molecular and Cellular Aspects of Development. Harper und Row (1965)

Monroy, A. and Tsaner, R. ed.: Biochemistry of Cell Differentiation, Academic Press London (1973)

In jüngster Zeit wurden einige Symposien abgehalten, die sich mit ›Zelldifferenzierung und Entwicklung‹ befaßten. Darüber erschienen jeweils Berichte. Sie stellen gegenwärtig zweifellos für dieses Gebiet die beste Übersicht dar.

Smith, J. E. and Ashworth, J. M.: Editors of Microbial Differentiation. 23rd. Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press (1973)
Davies, D. D. and Balls, M.: Editors of Control Mechanismus of Growth and Differentiation. 25th. Symposium of the Society for Experimental Biology. Cambridge University Press (1971)

Sachregister



Naturwissenschaften

DM 8,80

ISBN 3-437-20128-X